

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



# Validação da Quantificação de Catinonas por qRMN $^1\text{H}$ em drogas com efeitos psicoativos

Rudi Leonel Terreiros da Fonseca Lopes

Dissertação  
Mestrado em Química  
Química

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



# Validação da Quantificação de Catinonas por qRMN $^1\text{H}$ em drogas com efeitos psicoativos

Rudi Leonel Terreiros da Fonseca Lopes

Dissertação orientada por:

Doutora Helena Margarida Guerreiro Galla Gaspar

Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Mestrado em Química

Química

## **Agradecimentos**

Durante o tempo que conduziu a esta dissertação, muitas foram as pessoas que, científica e pessoalmente, contribuíram para a sua realização. Por isso, gostaria de lhes endereçar os meus mais sinceros agradecimentos.

À minha orientadora Prof. Doutora Helena Gaspar um agradecimento muito especial: pelo apoio incondicional, pela dedicação, disponibilidade, ajuda, supervisão e análise crítica deste trabalho, pela confiança como minha orientadora mas, acima de tudo, por ser uma grande cientista, uma amiga e uma Senhora cheia de valores, por quem tenho e terei sempre muita admiração e respeito.

Ao Prof. Doutor Ricardo Bettencourt da Silva, meu orientador, pela constante ajuda, pela disponibilidade na realização da parte analítica deste trabalho, pela prontidão que demonstrou sempre que solicitado e pelo gosto com que partilha tão grande sabedoria.

À Prof. Doutora Maria José Brito pela ajuda e disponibilidade na realização das experiências de espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Aos meus colegas de Faculdade pela ajuda prestada.

Aos meus amigos pelo apoio, amizade e companheirismo.

Finalmente, um agradecimento muito especial à minha família. Ao meu irmão por todas as vezes que me foi buscar e levar a Coimbra! Aos meus pais, em especial à minha Mãe, pela força, apoio e incentivo diários, sem eles isto nunca teria sido possível.

Do fundo do coração, a todos o mais sincero OBRIGADO, por tudo!

## Resumo

Catinona, o principal princípio ativo da planta *Catha edulis*, tem sido usado como um modelo para o desenvolvimento de vários derivados sintéticos que rapidamente chegaram ao mercado das “drogas legais”. Estas drogas sintéticas são intencionalmente comercializadas como alternativa às drogas ilegais, com o objetivo de contornar a legislação. A rapidez com que estas drogas sintéticas aparecem no mercado e surgem em diversas formulações e cocktails, constitui um grande risco para a saúde dos consumidores. Por essa razão, é extremamente importante conhecer a composição destes produtos tanto em termos qualitativos como em termos quantitativos. Estas catinonas são normalmente vendidas na europa como “fertilizantes” para dissimular o seu tipo de consumo.

Este trabalho consistiu na validação detalhada da quantificação da fletedrona, metedrona e 4-metil-N-etilcatinona em drogas sintéticas por qRMN  $^1\text{H}$ , usando como padrão interno o ácido maleico. Os procedimentos de medição foram posteriormente aplicados à caracterização de diversos “fertilizantes” comprados em *smartshops* portuguesas antes da proibição da sua venda em Portugal (**Decreto-Lei nº54/2013**).

A validação das quantificações por qRMN de  $^1\text{H}$  envolveram um estudo do desempenho de todas as etapas analíticas individualmente e da determinação do valor de referência da calibração, cujas incertezas foram posteriormente combinadas usando o método numérico de Kragten. Os pressupostos do método de Kragten, nomeadamente de linearidade da equação modelo em função da incerteza das quantidades de entrada, foram comprovados como válidos. A toma de amostras por pesagem consistem na componente de incerteza maioritária devido à quantidade pesada e tipo de balança disponível.

O procedimento de medição desenvolvido assegura a produção de resultados com uma incerteza expandida relativa nunca superior a 5,6%, o que permite distinguir diferenças de 10% na composição de catinonas em diversos produtos.

## Abstract

Cathinone, the main active principle of the plant *Catha edulis*, has been used as a prototype for the development of several synthetic derivatives that quickly came to market of legal drugs. These *designer drugs* are intentionally marketed as alternatives to illegal ones, aiming to circumvent drug legislation. The astonishing rate, at which new *designer drugs* appear, makes their impact on user's health unpredictable. Therefore it is extremely important to know the composition of these products. For this reason, it is extremely important to know the composition of these products both qualitatively and quantitatively. These cathinones are usually sold in Europe as "plant feeders" to conceal their type of consumption.

This work consisted of detailed validation of the quantification of flephedrone, methedrone and 4-MEC synthetic drugs qRMN  $^1\text{H}$ , using as internal standard maleic acid. The measurement procedures were then applied to the characterization of several "fertilizer" in Portuguese smartshops bought before the ban on its sale in Portugal (**Decreto-Lei nº54/2013**)

Validation of measurements by  $^1\text{H}$  qNMR involved a study of the performance of all analytical steps individually and determining the benchmark calibration, whose uncertainties were then combined using the numerical method of Kragten. The assumptions made in the Kragten, including linearity of the model equation due to the uncertainty of the input quantities were confirmed as valid. The weight of the samples by weighing consist of the majority component uncertainty due to the heavy amount and type of scale available.

The measuring procedure developed ensures the production of an expanded uncertainty results on never exceeding 5.6%, which allows to distinguish differences in the composition of 10% cathinones in various products.

## Abreviaturas e símbolos

**3,4 – DMMC** – 3,4-dimetil-metcatinona

**4-FMC** – Flefedrona

**4-MEC** – 4-metil-N-etilcatinona

**AM** – Ácido Maleico

**BPP** – modelo Bloembergen-Purcell-Pound

**CAT** – Catinona

**D<sub>2</sub>O** – Água deuterada

**DSS** – 3-(Trimetilsilil)-1-propano-sulfonato de sódio

**FID** – Flame Ionization Detector

**I** – spin nuclear

**m** – massa

**M<sub>0</sub>** – magnetização no estado de equilíbrio

**MDMA** – 3,4-metilenodioxo-N-metanfetamina (*ecstasy*)

**MDPV** – 3,4-metilenodioxipirovalerona

**MeOD** – Metanol deuterado

**M<sub>z</sub>** – magnetização ao longo do eixo do z

**NDP** – Novas drogas psicoativas

**OEDT** – Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PMMA** – para-metoxi-N-metilanfetamina

**qRMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Protão em condições de quantificação

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância Magnética Nuclear de Protão

**T<sub>1</sub>** – tempo de relaxação

**UE** – União Europeia

**UNODC** – United Nations Office on Drugs and Crime

**VIM** – Vocabulário Internacional de Metrologia

**βk-PMMA** – Metedrona

**τ** – Intervalo de tempo entre os pulsos

**s'** – desvio padrão relativo

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	iii
Abreviaturas e símbolos.....	iv
Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Drogas Legais.....	1
1.2. Catinonas Sintéticas .....	2
1.2.1. Flefedrona, Metedrona e 4-MEC.....	4
1.3. Ressonância Magnética Nuclear .....	7
1.3.1. Noções Gerais.....	7
1.3.2. Quantificação através de RMN <sup>1</sup> H.....	8
2. PARTE EXPERIMENTAL .....	12
2.1. Equipamento .....	12
2.2. Solventes e padrões .....	12
2.3. Amostras .....	13
2.4. Preparação das amostras .....	14
2.4.1. Solução Padrão de ácido maleico (PI) .....	14
2.4.2. Solução Padrão de DSS.....	14
2.4.3. Solução de ácido maleico e DSS .....	14
2.4.4. Soluções dos produtos das <i>smartshops</i> sem PI.....	14
2.4.5. Soluções dos produtos das <i>smartshops</i> com PI .....	15
2.5. Desenvolvimento da metodologia de qRMN <sup>1</sup> H .....	15
2.6. Cálculo das incertezas .....	16
2.7. Quantificação da Flefedrona, Metedrona e 4-MEC nos produtos das <i>Smartshops</i> ....	17
3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	18
3.1. Desenvolvimento da metodologia .....	18
3.1.1. Escolha do padrão interno (PI).....	19
3.1.2. Identificação das catinonas .....	22
3.1.3. Determinação do tempo de relaxação T1 .....	29
3.2. Quantificação .....	30
3.3. Incertezas .....	34

3.3.1.	Incerteza da massa molar .....	34
3.3.2.	Incerteza associada às massas medidas.....	35
3.3.3.	Incerteza associada a uma medição de volume (usando uma micropipeta ou seringa) 35	
3.3.4.	Incerteza associada à pureza do ácido maleico .....	37
3.3.5.	Incerteza da razão dos sinais de RMN $^1\text{H}$ .....	37
3.3.6.	Incerteza associada aos fatores de diluição .....	38
3.3.7.	Incerteza Combinada .....	39
3.3.8.	Incerteza Expandida .....	41
3.4.	Aplicação da metodologia validada .....	43
4.	CONCLUSÃO .....	51
5.	BIBLIOGRAFIA.....	52
I.	Anexos 1 – Espectros de qRMN de $^1\text{H}$ .....	56
II.	Anexos 2 – Tabelas de desvios químicos.....	62
III.	Anexos 3 – Tabelas de dados das integrações .....	67
IV.	Anexos 4 – Cálculos das incertezas .....	78



## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Estruturas químicas da anfetamina, metanfetamina e MDMA na forma de base livre.....	2
Figura 1.2 – Estrutura geral de uma catinona.....	3
Figura 1.3 – Estrutura química da catinona e catina na forma de base livre.....	4
Figura 1.4 – Estruturas químicas da flefedrona (1.1), metedrona (1.2) e 4-MEC (1.3).....	5
Figura 1.5 – Estrutura química da metanfetamina, metcatinona e flefedrona.....	5
Figura 1.6 – Estrutura química da PMMA e da metedrona.....	5
Figura 1.7 – Estrutura química da anfetamina e da 4-MEC.....	6
Figura 1.8 – Sequência de pulsos.....	10
Figura 1.9 – Gráfico inversão-recuperação que permite calcular o tempo de relaxação.....	10
Figura 3.1 – Ampliação do espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400 MHz de uma solução de DSS em $\text{D}_2\text{O}$ com uma concentração de $11,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons do DSS.....	20
Figura 3.2 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ , a 400 MHz, do DSS ( $11,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e da amostra Balst01 ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).....	20
Figura 3.3 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz, de $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ácido maleico em $\text{D}_2\text{O}$ . A figura identifica os sinais dos prótons do AM.....	21
Figura 3.4 – Ampliação dos espectros de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) de soluções em $\text{D}_2\text{O}$ das diversas amostras sem PI [Blast01_ $\text{D}_2\text{O}$ , Blast22_ $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss02_ $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss25_ $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss26_ $\text{D}_2\text{O}$ , Blow04_ $\text{D}_2\text{O}$ , Blow29_ $\text{D}_2\text{O}$ , Blow30_ $\text{D}_2\text{O}$ , Bloom03_ $\text{D}_2\text{O}$ , Bloom27_ $\text{D}_2\text{O}$ e Bloom28_ $\text{D}_2\text{O}$ ] e do ácido maleico [Ácido Maleico_CRM_Fluka_ $\text{D}_2\text{O}$ ] na zona $\delta 6,6\text{-}6,2\text{ppm}$ .....	22
Figura 3.5 – Espectro RMN $^1\text{H}$ do Blast01 ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) a 400MHz com um teor de ácido maleico de (Padrão interno) $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da flefedrona (3.1).....	24
Figura 3.6 – Espectros de RMN $^1\text{H}$ das soluções amostras Blast22 e Blast01 (Blast22_PI_ $\text{D}_2\text{O}$ e Blast01_PI_ $\text{D}_2\text{O}$ ) com concentração de $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ preparada em $\text{D}_2\text{O}$ , que contêm a catinona flefedrona (3.1). Estas soluções têm um teor de ácido maleico (PI) de $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ .....	25
Figura 3.7 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz, da solução amostra Bliss02 ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com um teor de ácido maleico de $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da metedrona (3.2).....	26
Figura 3.8 – Espectros de RMN $^1\text{H}$ de soluções amostra preparadas em $\text{D}_2\text{O}$ ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com ácido maleico (PI) ( $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Estas amostras contêm a catinona metedrona (3.2).....	27
Figura 3.9 – Espectro RMN $^1\text{H}$ da solução amostra Blow04 ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) a 400MHz com um teor de padrão interno ácido maleico $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da 4-MEC (3.3).....	28
Figura 3.10 – Espectros de RMN $^1\text{H}$ de soluções amostra de Blow e Bloom preparadas em $\text{D}_2\text{O}$ ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com ácido maleico (PI) ( $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As soluções amostra contêm a catinona 4-MEC (3.3).....	29
Figura 3.11 – Espectros RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 10 da solução de $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ das amostras Blast01 e Blast22.....	44
Figura 3.12 – Gráfico de variação do desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de flefedrona na solução amostra.....	45
Figura 3.13 – Espectros RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 10 da solução de $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ das amostras Bliss02, Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28.....	46

Figura 3.14 – Gráfico de variação do desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de metedrona na solução amostra. ....	47
Figura 3.15 – Espectros RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 11 da solução de 20 mg.mL $^{-1}$ das amostras Blow04, Bloom27, Blow29 e Blow30.....	48
Figura 3.16 – Gráfico de variação do desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de 4-MEC na solução amostra.....	49
Figura I.1 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Blast01” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	56
Figura I.2 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bliss02” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	56
Figura I.3 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Blow04” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	57
Figura I.4 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bloom03” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	57
Figura I.5 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Blast22” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	58
Figura I.6 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bliss25” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	58
Figura I.7 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bliss26” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	59
Figura I.8 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bloom27” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	59
Figura I.9 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Bloom28” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	60
Figura I.10 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Blow29” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	60
Figura I.11 – Espectro RMN $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20 mg.mL $^{-1}$ da amostra “Blow30” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .....	61

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Exemplo de algumas catinonas. ....	3
Tabela 1.2 – Efeitos clínicos da flefedrona, metedrona e 4-MEC. ....	6
Tabela 1.3 – Número quântico de <i>spin</i> nuclear ( <i>I</i> ) de alguns núcleos mais comuns. ....	7
Tabela 2.1 – Produtos adquiridos nas <i>smartshops</i> especificando a o local da aquisição, a catinona determinada em cada produto a toma de amostra com e sem adição de padrão interno (PI), e a utilização da amostra neste estudo (V – amostras usadas na validação; Q – amostras usadas na quantificação). ....	13
Tabela 3.1 – Substâncias psicoativas identificadas nas amostras das <i>smartshops</i> <sup>[49,50]</sup> ....	23
Tabela 3.2 – Desvios químicos, multiplicidade e constante de acoplamento da flefedrona (3.1) para os vários espectros RMN <sup>1</sup> H de soluções de Blast01 e Blast22 preparados em D <sub>2</sub> O e para o Blast01 preparado em MeOD <sup>[49,50]</sup> e D <sub>2</sub> O. ....	24
Tabela 3.3 – Desvio químico, multiplicidade e constante de acoplamento da metedrona (3.2) de espectros RMN <sup>1</sup> H de diversas amostras preparadas em D <sub>2</sub> O ou MeOD <sup>[49,50]</sup> . ....	26
Tabela 3.4 – Desvio químico, multiplicidade e constante de acoplamento da 4-MEC (3.3) para várias soluções amostra preparadas em MeOD <sup>[49,50]</sup> e D <sub>2</sub> O. ....	28
Tabela 3.5 – Tempos de relaxação T1 (s) para os prótons das 3 catinona e do ácido maleico. .	30
Tabela 3.6 – Equações usadas para calcular a fração mássica da flefedrona (3.1), metedrona (3.2) e 4-MEC (3.3). ....	32
Tabela 3.7 – Frações mássicas (%) estimadas de flefedrona no produto Blast01, em função dos sinais de ressonância da flefedrona para cada solução amostra de concentração em Blast01 (2, 4 e 20 mg.mL <sup>-1</sup> ). ....	33
Tabela 3.8 – Frações mássicas (%) estimadas de metedrona no produto Bliss02, em função dos sinais de ressonância da metedrona para cada solução amostra de concentração em Bliss02 (2, 4 e 20 mg.mL <sup>-1</sup> ). ....	33
Tabela 3.9 – Frações mássicas (%) estimadas de 4-MEC no produto Blow04, em função dos sinais de ressonância da 4-MEC para cada solução amostra de concentração em Blow04 (2, 4 e 20 mg.mL <sup>-1</sup> ). ....	33
Tabela 3.10 – Valores das incertezas da massa molar. ....	34
Tabela 3.11 – Componentes de incerteza e incerteza combinada das medições de volume realizada no procedimento experimental. ....	37
Tabela 3.12 – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (3.1, 3.2 e 3.3) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	37
Tabela 3.13 – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (3.1, 3.2 e 3.3) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de 4 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	38
Tabela 3.14 – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (3.1, 3.2 e 3.3) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	38
Tabela 3.15 – Incerteza padrão, <i>uFd</i> , e incerteza padrão relativa, <i>u'Fd</i> , dos fatores de diluição da solução de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	38
Tabela 3.16 – Exemplo da implementação do método de Kragten, para a combinação de componentes de incerteza, numa folha de cálculo. ....	39

Tabela 3.17 – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a flefedrona, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da flefedrona nas soluções amostra de diferentes concentrações em Blast01.....	40
Tabela 3.18 – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a metedrona, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da metedrona nas soluções amostra de diferentes concentrações em Bliss02. ....	40
Tabela 3.19 – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a 4-MEC, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da 4-MEC nas soluções amostra de diferentes concentrações em Blow04.....	40
Tabela 3.20 – Valores estimados de fração mássica ( $W_{CAT}$ ) de flefedrona na amostra Blast01, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Blast01.....	41
Tabela 3.21 – Valores estimados de fração mássica ( $W_{CAT}$ ) de metedrona na amostra Bliss02, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Bliss02. ....	42
Tabela 3.22 – Valores estimados de fração mássica ( $W_{CAT}$ ) de 4-MEC na amostra Blow04, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Blow04.....	42
Tabela 3.23 – Valores de concentração de flefedrona na solução amostra, $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do protão relacionado com o carbono 10 da flefedrona e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Blast01. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A. ....	45
Tabela 3.24 – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de flefedrona na amostra Blast22. Teor de flefedrona na solução amostra, $C_{CAT}$ , $s'$ estimado pelo modelo descrito na figura 3.11 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2.....	45
Tabela 3.25 – Valores de concentração de metedrona na solução amostra, $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do protão relacionado com o carbono 10 da metedrona e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Bliss02. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A. ....	47
Tabela 3.26 – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de metedrona nas amostras Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28. Teor de metedrona na solução amostra, $C_{CAT}$ , $s'$ estimado pelo modelo descrito na figura 3.12 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2. ....	47
Tabela 3.27 – Valores de concentração de 4-MEC na solução amostra, $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo, $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do protão relacionado com o carbono 11 da 4-MEC e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Blow04. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A.....	49

Tabela 3.28 – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de 4-MEC nas amostras Bloom27, Blow29 e Blow30. Teor de 4-MEC na solução amostra, $C_{CAT}$ , $s'$ estimado pelo modelo descrito na figura 3.13 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2. ....	49
Tabela 3.29 – Fração mássica das diversas catinonas nas amostras analisadas, expressos em percentagem e com incerteza expandida, considerando os sinais de RMN que garantem menores incertezas. A incerteza expandida foi estimada para um nível de confiança de aproximadamente 95% utilizando um fator de expansão de 2. ....	50
Tabela II.1– Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de flefedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	62
Tabela II.2 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de flefedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	62
Tabela II.3 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de flefedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	63
Tabela II.4 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	63
Tabela II.5 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	64
Tabela II.6 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	64
Tabela II.7 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	65
Tabela II.8 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	65
Tabela II.9 – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	66
Tabela III.1 – Intervalos de desvios químicos (ppm) definidos para a integração dos vários sinais das catinonas flefedrona, metedrona e 4-MEC. ....	67
Tabela III.2 – Valores das integrações dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	67
Tabela III.3 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	68

Tabela III.4 – Valores da integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	68
Tabela III.5 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	69
Tabela III.6 – Valores da integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	69
Tabela III.7 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	70
Tabela III.8 – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 20 mg.mL <sup>-1</sup> .....	70
Tabela III.9 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> .....	71
Tabela III.10 – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	71
Tabela III.11 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	72
Tabela III.12 – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	72
Tabela III.13 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	73
Tabela III.14 – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 20 mg.mL <sup>-1</sup> .....	73
Tabela III.15 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL <sup>-1</sup> .....	74
Tabela III.16 – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	74
Tabela III.17 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL <sup>-1</sup> .....	75
Tabela III.18 – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	75

Tabela III.19 – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL <sup>-1</sup> .....	76
Tabela III.20 – Valores de integração dos sinais das catinonas utilizados para quantificar as amostras dos produtos das <i>smartshops</i> . ....	76
Tabela III.21 – Valores das razões da integração para o sinal utilizado para quantificar a flefedrona, a metedrona, e a 4-MEC nas amostras dos produtos das <i>smartshops</i> . ....	77

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1. Drogas Legais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma droga é toda a substância, natural ou não, que modifica as funções normais do organismo. Esta definição engloba tanto substâncias lícitas como fármacos, álcool, tabaco ou cafeína, quer as substâncias ilícitas como cocaína, heroína, *ecstasy*, entre outras <sup>[1,2]</sup>.

Atualmente existe uma série de *drogas legais* com efeitos psicoativos com grandes popularidades entre os adolescentes e jovens adultos. O facto destas drogas poderem ser adquiridas facilmente via internet ou em lojas chamadas *smartshops*, criou a falsa ideia entre os consumidores de que estas substâncias são mais seguras para o consumo que as drogas abrangidas pela legislação de controlo de estupefacientes em vigor. O termo *drogas legais* inclui não só as *designer drugs* mas também uma série de misturas de ervas naturais. Estas diversas drogas podem ser vendidas de forma dissimulada (tais como ambientadores, incensos, sais de banho, rações para animais ou fertilizantes e com a advertência de que não são para consumo humano).

*Drogas legais* é o termo usado para designar substâncias que tem estruturas químicas diferentes das substâncias ilícitas e que são fabricadas para imitar ou produzir efeitos semelhantes às drogas ilegais, como cocaína, *ecstasy* e cannabis <sup>[3,4,5]</sup>. Por isso, são uma alternativa legal às drogas ilícitas. Tem-se verificado que alguns destes produtos provocam intoxicações, com padrões clínicos semelhantes ao consumo de drogas estimulantes como as anfetaminas e a cocaína, o que torna imperativo o estudo químico destes produtos bem como a avaliação da sua atividade toxicológica <sup>[3,4,5]</sup>.

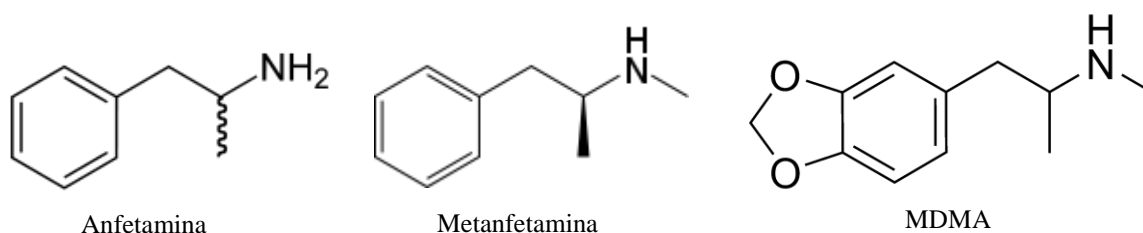
Recentemente, foi publicado o **Decreto-Lei nº54/2013** que proíbe a produção e comercialização de cerca de 159 novas substâncias psicoativas em Portugal, sendo passível de atualização de modo a conseguir acompanhar o aparecimento de novas substâncias <sup>[6]</sup>.



## 1.2. Catinonas Sintéticas

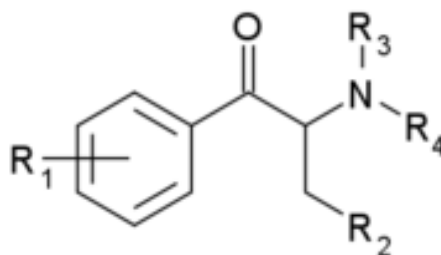
As catinonas sintéticas são um novo grupo de drogas popularmente conhecidas como “sais de banho (bath salts)” ou “fertilizantes” (plant feeders), que surgiram recentemente em vários países. O termo “sais de banho” é usado principalmente nos Estados Unidos enquanto na Europa o termo mais comum é “fertilizantes”. Estas drogas são parte de uma nova onda de *drogas legais* (ou novas drogas psicoativas, NDP) [17]. São vendidas a preço mais baixo que as drogas ilícitas e podem ser adquiridas em lojas de conveniência, postos de gasolina, algumas lojas de tabaco e Internet, as lojas online são as que possuem maior flexibilidade e rápida adaptação a mudanças no *status legal* destas substâncias psicoativas [8,9,10-13].

Alguns produtos apresentam etiquetas com avisos “impróprio para consumo humano” ou “tóxicos”, mas têm como destino produzir efeitos semelhantes aos estimulantes ilegais, como, por exemplo, anfetaminas, metanfetaminas, MDMA (ecstasy) ou cocaína (**Figura 1.1**) [14,15]. Além disso, o rótulo não dá qualquer informação da presença de compostos psicoativos e pouca ou nenhuma informação sobre o risco do seu consumo. Os componentes destas drogas podem variar significativamente, tanto quantitativamente como qualitativamente, mesmo considerando a mesma marca e produto. Em conjunto estes fatores representam uma ameaça grave para os consumidores [15-21].



**Figura 1.1** – Estruturas químicas da anfetamina, metanfetamina e MDMA na forma de base livre.

A **Figura 1.2** apresenta a estrutura geral das catinonas onde estão representadas as diversas variantes de substituintes ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ). A **Tabela 1.1** apresenta os nomes de diversas catinonas identificando os diversos substituintes.



**Figura 1.2** – Estrutura geral de uma catinona.

- R<sub>1</sub> - hidrogénio, ou qualquer combinação de um ou mais alquilos, alcóxidos, alquilenos dióxido, halo-alquilo ou substituintes de halogenetos.
- R<sub>2</sub> - hidrogénio, ou um grupo alquilo.
- R<sub>3</sub> - hidrogénio, um grupo alquilo, ou incorporação de uma estrutura cíclica.
- R<sub>4</sub> - hidrogénio, um grupo alquilo, ou incorporação de uma estrutura cíclica.

**Tabela 1.1** – Exemplo de algumas catinonas.

Composto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )
<b>Catinona</b>	-	H	H	H	149,08
<b>Metilcatinona</b>	-	H	H	Metilo	163,10
<b>Butilona</b>	3,4-Metilenodioxilo	Metilo	H	Metilo	221,11
<b>Nafirona</b>	β -nafetilo em vez do fenilo	Etilo	Pirrolidinilo		281,18
<b>MDPV</b>	3,4-Metelodioxilo	Etilo	Pirrolidinilo		275,15
<b>Pentedrona</b>	-	Etilo	H	Metilo	191,13
<b>Etilcatinona</b>	-	H	H	Etilo	177,12
<b>Bufedrona</b>	-	Metilo	H	Metilo	177,12
<b>Metdrona</b>	4-Metilo	H	H	Metilo	191,13
<b>Flefedrona</b>	4- Flúor	H	H	Metilo	181,09
<b>Metedrona</b>	4-Metoxilo	H	H	Metilo	191,11
<b>4-metil-N-etilcatinona</b>	4-Metilo	H	H	Etilo	191,13

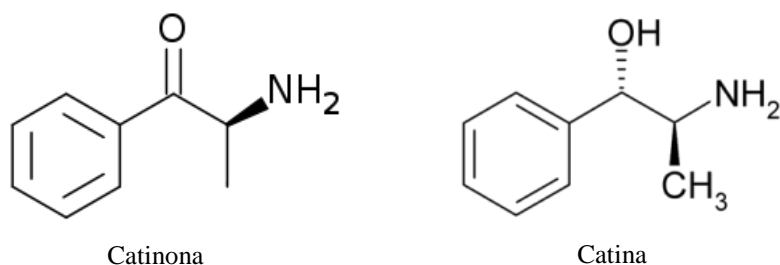
Apesar da crescente popularidade das catinonas sintéticas, muito pouco se sabe sobre a sua química e atividade biológica que resulta de semelhanças estruturais com vários derivados da anfetamina.

A a análise das propriedades físico-químicas das catinonas, por modelação molecular indica que estes compostos são consideravelmente menos lipofílicos e têm uma menor penetração através na barreira sangue-cérebro, quando comparado com os

análogos metil-anfetaminas <sup>[22]</sup>. Acredita-se que estas propriedades moleculares das catinonas apresentam valores suficientes para produzir efeitos semelhantes ao das anfetaminas <sup>[23]</sup>.

As catinonas encontradas nos produtos das *smartshops* são análogos sintéticos da catinona natural (S-(-)-2-amino-1-fenilpropan-1-ona), um dos alcaloides psicoativos presentes na planta de *Catha edulis* (*kath*)<sup>[24]</sup>. O *khat* contém a catinona e a catina (**Figura 1.3**). A catinona é um alcaloide, derivado β-cetônico da anfetamina, que pertence à classe das fenilalquilaminas, não é muito estável, sendo encontrada principalmente em folhas jovens e nos rebentos. Durante o processo de secagem da planta, a catinona sofre degradação <sup>[2,25,26]</sup>.

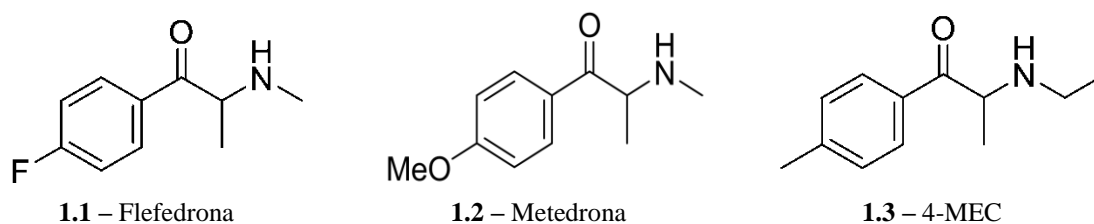
As catinonas sintéticas surgiram nos mercados de drogas em meados do ano 2000. Em 2005, a metilona, um análogo da MDMA, foi a primeira catinona sintética relatada para o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência (OEDT) <sup>[27,28]</sup>. Respostas ao questionário da UNODC indicaram que outras catinonas sintéticas, incluindo butilona, 4-metil-N-etilcatinona (4-MEC), flefedrona, naifrona, metedrona, MDPV e pentedrona (**Tabela 1.1**), têm sido cada vez mais utilizadas desde 2010 como novas substâncias psicoativas <sup>[29-31]</sup>.



**Figura 1.3** – Estrutura química da catinona e catina na forma de base livre.

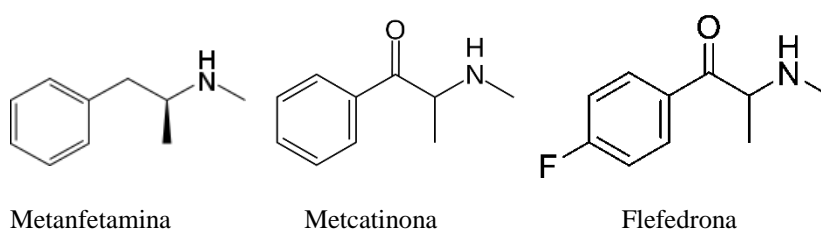
### 1.2.1. Flefedrona, Metedrona e 4-MEC

Neste trabalho, os produtos de *smartshops* que foram caracterizados contêm as catinonas flefedrona (**1.1**), metedrona (**1.2**) e 4-metil-N-etilcatinona (**1.3**) mais conhecida por 4-MEC (**Figura 1.4**), que são substâncias estimulantes que entraram no mercado das drogas “legais” em 2008. Estas drogas eram habitualmente vendidas, na Europa, de forma dissimulada como “fertilizantes” <sup>[1,8]</sup>.



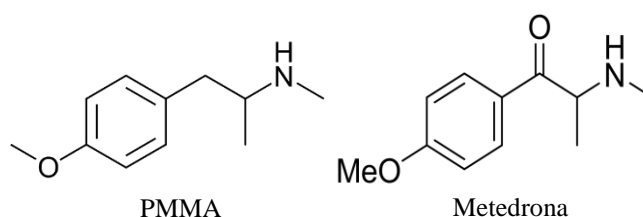
**Figura 1.4** – Estruturas químicas da flefedrona (1.1), metedrona (1.2) e 4-MEC (1.3).

A informação sobre a flefedrona (1.1) é relativamente baixa em comparação com outras catinonas como, mefedrona ou MDPV, mas os dados existentes, mostram semelhanças com a metanfetamina e metcatinona (**Figura 1.5**) embora os efeitos sejam menos nocivos. Tem sido demonstrado que a flefedrona é um inibidor seletivo da recaptação de dopamina e norepinefrina pelos seus respetivos transportadores<sup>[32]</sup>. O único caso relato envolvendo a flefedrona foi de um paciente que ingeriu uma mistura de flefedrona, MDPV e cafeína, apresentando comportamento bizarro, alucinações e agitação<sup>[32,33]</sup>.



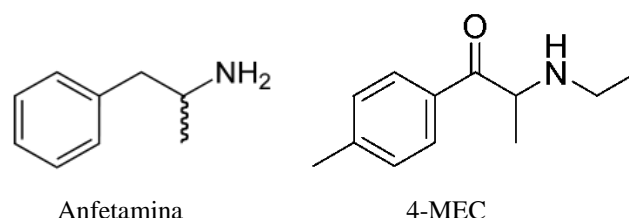
**Figura 1.5** – Estrutura química da metanfetamina, metcatinona e flefedrona.

A metedrona (1.2) é um medicamento de investigação clínica, apresenta propriedades estimulantes e euforizantes efeitos muito semelhantes à mefedrona, e ao contrário da mefedrona pouco se sabe sobre o perfil de segurança da metedrona. Está intimamente relacionada com a PMMA (**Figura 1.6**), uma droga que já causou várias mortes<sup>[34]</sup>. É muito possível que a metedrona tenha um risco elevado de toxicidade, já tendo provocado duas mortes no norte da Europa<sup>[35]</sup>.



**Figura 1.6** – Estrutura química da PMMA e da metedrona.

Entre todos os tipos de catinona, a 4-MEC tem sido uma das mais apreendidas pelas entidades competentes. Para além do efeito estimulante também tem um efeito euforizante como as anfetaminas (**Figura 1.7**) <sup>[8,36]</sup>. Inibe os transportadores da dopamina, noradrenalina e da absorção da serotonina <sup>[36]</sup>. Os estudos relacionados com risco do uso desta droga ainda são muito limitados, apesar de existirem relatos de morte, um deles por intoxicação fatal com 4-MEC <sup>[37-39]</sup>.



**Figura 1.7** – Estrutura química da anfetamina e da 4-MEC.

Os efeitos de desejados e adversos que estão associados ao consumo das catinonas flefedrona, metedrona e 4-MEC encontram-se referidos na **Tabela 1.2** <sup>[8,33,40]</sup>.

**Tabela 1.2** – Efeitos clínicos da flefedrona, metedrona e 4-MEC.

Catinona	Efeitos desejados	Efeitos adversos
Flefedrona	Euforia	Ansiedade
	Perda de apetite	Insónia
	Aumento do humor	Nervosismo
Metedrona		Ansiedade
		Agressividade
	Euforia	Insónia
	Aumento da energia	Nervosismo
	Estimulante sexual	Paranoia
	Estado de alerta	Aumento da pressão arterial
	Vontade de falar	Depressão
4-MEC		Cansaço
		Dilatação das pupilas
	Euforia	Ansiedade
	Aumento da energia	Agressividade
	Estimulante sexual	Insónia
	Diminuição dos sentimentos hostis	Nervosismo
	Aumento à percepção da música	Paranoia

## 1.3. Ressonância Magnética Nuclear

### 1.3.1. Noções Gerais

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que se baseia na absorção de radiofrequências por certos núcleos de uma molécula quando submetidos a um campo magnético forte <sup>[41,42]</sup>.

Para explicar as propriedades de certos núcleos, é necessário assumir que estes giram em torno de um eixo de modo a ter a propriedade de *spin*. Os núcleos com *spin* tem um momento angular  $p$ . Além disso, a componente máxima observada deste momento angular está quantizada e deve ser um múltiplo inteiro ou semi-inteiro de  $h/2\pi$ , onde  $h$  é a constante de Planck. O número máximo de componentes de *spin* ou os valores de  $p$  para um núcleo dependem do número de *spin* nuclear  $I$ , então, o núcleo tem  $2I + 1$  estados. Os estados de *spin* permitidos para um dado núcleo são distinguidos pelo número quântico magnético  $m_I$ , que pode tomar os valores de  $I, I - 1, I - 2, \dots, -I$  <sup>[41,42]</sup>.

Na ausência de um campo externo os distintos estados tem energia idêntica. Um núcleo com  $I = 1/2$ , como o núcleo de próton, tem 2 estados de *spin* com orientações distintas:  $m_I = -1/2$  e  $m_I = +1/2$  <sup>[41,42]</sup>.

Não existe uma regra simples para determinar o *spin* nuclear, núcleos com  $I = 0$  não tem momento angular nem momento magnético, logo não são ativos em ressonância magnética nuclear. Na **Tabela 1.3** estão representados os números quânticos de *spin* nuclear ( $I$ ) de alguns núcleos mais comuns <sup>[42]</sup>.

**Tabela 1.3** – Número quântico de *spin* nuclear ( $I$ ) de alguns núcleos mais comuns.

$I$	Núcleo
0	<sup>12</sup> C, <sup>16</sup> O
1/2	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N, <sup>19</sup> F, <sup>29</sup> Si, <sup>31</sup> P
1	<sup>2</sup> H, <sup>14</sup> N
3/2	<sup>11</sup> B, <sup>23</sup> Na, <sup>35</sup> Cl, <sup>37</sup> Cl
5/2	<sup>17</sup> O,
3	<sup>10</sup> B

O sinal da espectroscopia de RMN de próton resulta, da diferença entre a energia absorvida pelos spins que efetuam uma transição do estado menor energia para o estado de maior energia e a energia emitida pelos mesmos que simultaneamente efetuam uma

transição do nível de energia superior para o de energia inferior. O sinal é então proporcional à diferença populacional entre os estados considerados. Uma vez que a capacidade de detetar estas pequenas diferenças populacionais é acentuada, a espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  torna-se num método sensível <sup>[46]</sup>.

Se os prótons de uma molécula qualquer perdessem todos os seus eletrões e fossem isolados dos outros núcleos, todos estes absorveriam a mesma energia de uma dada frequência de radiação eletromagnética num determinado campo magnético. Esta situação não corresponde à realidade. Numa molécula, alguns núcleos de hidrogénio estão em regiões de densidade eletrónica maior do que em outros, pelo que teremos prótons que absorvem energia em campos magnéticos de intensidade ligeiramente diferentes. Como resultado teremos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  que aparecem em diferentes posições, isto é, diferentes desvios químicos <sup>[41,46]</sup>.

Porém, a intensidade do campo em que a absorção ocorre depende sensivelmente das vizinhanças magnéticas de cada próton. O mecanismo pelo qual as vizinhanças químicas modificam o campo magnético,  $B_0$  num dado núcleo depende do tipo de ligações e de átomos que rodeiam o núcleo em questão. Estas vizinhanças magnéticas, por sua vez, dependem de dois fatores, dos campos magnéticos gerados pelos eletrões em movimento e dos campos magnéticos que proveem de outros prótons vizinhos (acoplamentos de spin entre núcleos de  $^1\text{H}$ ) <sup>[41,46]</sup>.

A primeira característica a realçar no espectro de RMN  $^1\text{H}$  é a relação entre o número de sinais no espectro e o número de tipos diferentes de átomos de hidrogénio no composto. O que é importante na análise de um sinal no espectro não é a sua altura, mas a área subentendida pelo pico. Estas áreas, quando medidas com exatidão, estão entre si na mesma razão que o número de átomos de hidrogénio que provocam cada sinal. Deste modo, a área limitada por uma banda de ressonância é proporcional ao número de núcleos responsáveis por essa absorção <sup>[46]</sup>.

### 1.3.2. Quantificação através de RMN $^1\text{H}$

A ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) para além de ser um método rápido, sensível, preciso, exato, reproduzível e versátil na identificação e caracterização de moléculas orgânicas é também usada com sucesso na quantificação de compostos principalmente na Indústria farmacêutica. Diverge da cromatografia por não necessitar de

um padrão de elevada pureza, porque é uma técnica espectroscópica que responde aos prótons do analito que em qualquer molécula têm um coeficiente de absorção molar de 1, assumindo que não existem trocas com os átomos de deutério do solvente e que o espectro foi realizado em condições de quantificação <sup>[44]</sup>. Outra vantagem da RMN <sup>1</sup>H prende-se com o facto de não haver uma interface que possibilite a absorção do analito, o que a torna, por um lado, mais precisa em relação às técnicas cromatográficas, e por outro, dispensa o uso de um “branco” na análise.

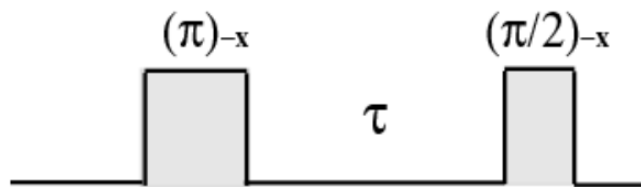
Na quantificação através da ressonância magnética nuclear de próton (qRMN <sup>1</sup>H) é necessário apenas ter um composto padrão de pureza conhecida, que pode ou não ser estruturalmente relacionado com o analito, e um sinal de ressonância que não se sobreponha aos do analito. É necessário apresentar uma solubilidade semelhante ao analito e uma baixa volatilidade. Assim a concentração do analito pode ser determinada em relação ao composto padrão <sup>[43,44]</sup>.

Um dos processos mais importantes na quantificação através da ressonância magnética nuclear de próton é a determinação do tempo de relaxação ( $T_1$ ) dos prótons do analito e do padrão interno (PI), para garantir que todos os núcleos de interesse relaxem antes de se aplicar um novo pulso, e consequentemente a integração das áreas de ressonância seja diretamente proporcional à concentração do analito e do PI. Deste modo, após estimado o tempo de relaxação  $T_1$  é calculado o tempo de recuperação (“delay”) entre os pulsos consecutivos que deverá ser maior ou igual  $5 \times T_1$  <sup>[43,44]</sup>.

A relaxação é causada pelas flutuações de campos magnéticos provocados pela interação magnética dipolo-dipolo, ou por outras interações magnéticas. Após um pulso de radiofrequência de 90° a magnetização é restaurada ao seu valor de equilíbrio devido ao efeito de relaxação, que é a recuperação  $M_z$  ao longo do eixo  $z$ , chamado de relaxação spin-rede ou longitudinal. Para que o equilíbrio seja perfeitamente restaurado é necessário que exista distribuição da magnetização também no plano  $xy$ , este processo é designado por relaxação spin-spin ou transversal ( $T_2$ ) <sup>[45]</sup>.

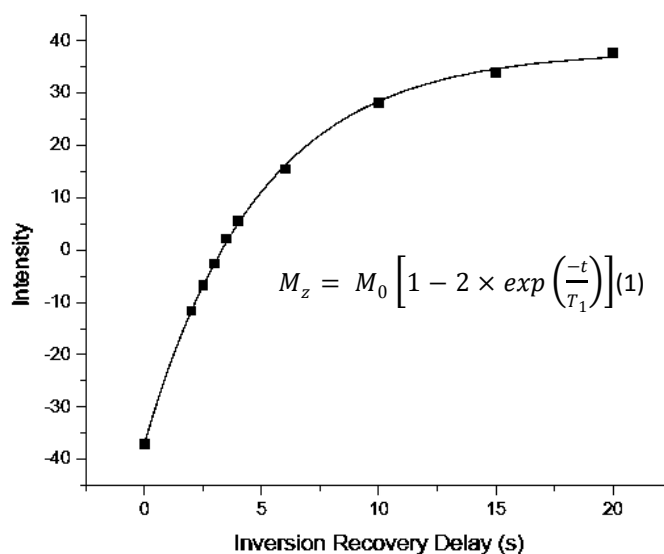
Existem vários métodos para calcular o tempo de relaxação  $T_1$ , o método mais utilizado é o inversão-recuperação, o qual consiste em aplicar a sequência de pulso 180°  $\tau$  90° (**Figura 1.8**) <sup>[46]</sup>.





**Figura 1.8** – Sequência de pulsos.

O pulso de  $180^\circ$  inverte a magnetização longitudinal e durante o intervalo de tempo  $\tau$  a magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal. Depois aplica-se um pulso de  $90^\circ$  para leitura do sinal, de seguida ao pulso de  $90^\circ$ , surge um FID cuja amplitude é diretamente proporcional ao valor da magnetização  $z$  no instante  $\tau$ . Então pode-se obter a evolução temporal longitudinal e, conseqüentemente o valor do tempo de relaxação  $T_1$ . A partir da obtenção de vários valores de  $T_1$  medidos em função da temperatura, consegue-se extrair o tempo de correlação e a energia de ativação do sistema através do modelo BPP (modelo Bloembergen-Purcell-Pound). Esta sequência de pulsos origina uma curva (**Figura 1.9**), que pode ser ajustada com a equação (1) [43,44,46].



**Figura 1.9** – Gráfico inversão-recuperação que permite calcular o tempo de relaxação.

A equação (1) descreve o comportamento da magnetização  $M_z$  em função de  $t$  (tempo), que permite obter o tempo de relaxação  $T_1$ .

Em Portugal é proibida a produção e comercialização de catinonas sintéticas desde Abril de 2013 <sup>[6]</sup>. No entanto, para responder a necessidade de identificar e quantificar estas substância psicoativas em produtos em circulação na Europa, na ausência de padrões destes analitos, é importante desenvolver uma metodologia rápida e eficaz para a sua identificação e quantificação. Neste contexto o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia de qRMN de  $^1\text{H}$  que permita quantificar as catinonas flefedrona (**1.1**), metedrona (**1.2**) e da 4-MEC (**1.3**) em produtos comercializados em *smartshops*.

Antes da aplicação de um procedimento de medição à análise de amostras desconhecidas, é necessário avaliar se este tem um desempenho adequado ao objetivo do ensaio. Esta avaliação constitui o objetivo da validação do procedimento de medição. Geralmente são realizados ensaios químicos para comparar a composição de diversos itens ou para avaliar a conformidade de um item com um limite legal ou de especificação.

Habitualmente, a validação de um procedimento de medição envolve a avaliação de diversas características de desempenho do método de análise, que culmina na avaliação da incerteza da medição; i.e. no cálculo de um valor quantitativos da qualidade da medição.

Neste trabalho, a validação do procedimento de medição das catinonas flefedrona (**1.1**), metedrona (**1.2**) e da 4-MEC (**1.3**) envolveu o estudo das diversas componentes de incerteza que afetam a qualidade do ensaio, permitindo assim concluir-se se o resultado está associada a uma incerteza suficientemente baixa para um determinado objetivo.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Equipamento

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) foram obtidos no espectrofotômetro *Bruker Avance 400* da FCUL, a uma frequência de 400,1MHz, usando o software *Topsin* (versão 2.1) para aquisição e processamento dos dados. Usou-se como solvente água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou uma solução de ácido maleico (AM) em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os valores dos desvios químicos foram expressos em ppm tomando como referência o valor do sinal do ácido maleico a 6,42 ppm.

Condições instrumentais de RMN  $^1\text{H}$  #1 – usou-se um programa de pulso  $\text{zg30}^\circ$  com uma acumulação de 16 scans, um tempo de recuperação de 2s de duração, uma largura espectral de 20 ppm e uma resolução digital de 10 pontos/Hz.

Condições de instrumentais RMN  $^1\text{H}$  (T1 RMN) #2 – usou-se um programa de medição T1 de inversão recuperação (t1ir) com uma acumulação de 8 scans, uma largura espectral de 12 ppm e uma resolução digital de 10 pontos/Hz.

As massas foram medidas numa balança analítica digital *Mettler ToledoPR11203*.

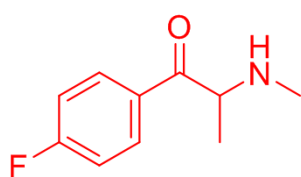
### 2.2. Solventes e padrões

Os solventes e os padrões foram adquiridos comercialmente. A água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) utilizada como solvente é da marca *sds*, possui uma densidade de 1,11 e uma pureza de 99,9 %. Utilizou-se como padrões neste trabalho o DSS (3-(Trimetilsilil)-1-propano-sulfonato de sódio) da *Sigma-Aldrich* com uma pureza de 97 % e o ácido maleico (AM) que é um material de referência certificado para quantificação por RMN da *Fluka*, com uma pureza de 99,99 %.

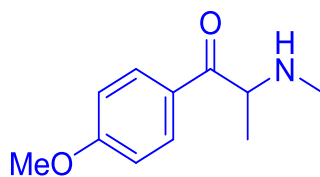
## 2.3. Amostras

Para a realização deste trabalho foram adquiridos 11 produtos nas lojas da cadeia Magic Mushroom de Lisboa e do Porto, e na loja Euphoria do Porto. Estes produtos vendidos como fertilizantes de plantas e com os nomes Blast, Bliss, Blow e Bloom foram designados neste trabalho como Blast01, Blast22, Bliss02, Bliss25, Bliss26, Blow04, Blow29, Blow30, Bloom03, Bloom27 e Bloom28 (**Tabela 2.1**).

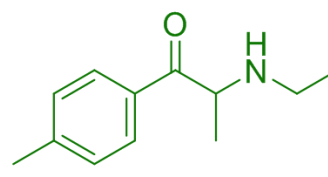
Na primeira parte do trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia de RMN  $^1\text{H}$  para a quantificação das catinonas: flefedrona (**2.1**), metedrona (**2.2**) e 4-MEC (**2.3**), utilizando os 3 produtos Blast01, Bliss02 e Blow04, respetivamente. Na segunda parte do trabalho, a metodologia validada foi aplicada à quantificação das catinonas nas restantes 8 amostras, Blast22, Bliss25, Bliss26, Blow29, Blow30, Bloom03, Bloom27, Bloom28 (**Tabela 2.1**).



**2.1** – Flefedrona



**2.2** – Metedrona



**2.3** – 4-MEC

**Tabela 2.1** – Produtos adquiridos nas *smartshops* especificando a o local da aquisição, a catinona determinada em cada produto a toma de amostra com e sem adição de padrão interno (PI), e a utilização da amostra neste estudo (V – amostras usadas na validação; Q – amostras usadas na quantificação).

Amostras	Uso	Loja	Distrito	Catinona	Toma c/ PI (mg)	Toma s/ PI (mg)
Blast01	V	Magic Mushroom	Lisboa	Flefedrona	10,55	10,00
Bliss02	V	Magic Mushroom	Lisboa	Metedrona	10,06	10,01
Blow04	V	Magic Mushroom	Lisboa	4-MEC	11,15	10,78
Bloom03	Q	Magic Mushroom	Porto	Metedrona	10,99	9,99
Blast22	Q	Euphoria	Porto	Flefedrona	10,57	10,57
Bliss25	Q	Magic Mushroom	Porto	Metedrona	10,47	40,38
Bliss26	Q	Magic Mushroom	Porto	Metedrona	10,04	9,91
Bloom27	Q	Magic Mushroom	Porto	4-MEC	9,99	8,55
Bloom28	Q	Magic Mushroom	Porto	Metedrona	10,45	9,75
Blow29	Q	Magic Mushroom	Porto	4-MEC	11,06	9,54
Blow30	Q	Euphoria	Porto	4-MEC	10,52	10,79

## 2.4. Preparação das amostras

### 2.4.1. Solução Padrão de ácido maleico (PI)

Para um balão volumétrico de 10 mL pesaram-se 103,42 mg de ácido maleico numa balança analítica. De imediato perfez-se o restante volume do balão volumétrico com água deuterada com ajuda de uma micropipeta.

### 2.4.2. Solução Padrão de DSS

Para um balão volumétrico de 5 mL pesou-se 55,1 mg de 3-(Trimetilsilil)-1-propano-sulfonato de sódio (DSS) com uma balança analítica. De seguida perfez-se o restante volume do balão volumétrico com água deuterada.

### 2.4.3. Solução de ácido maleico e DSS

Foram pesados para um frasco de vidro 5 mg de ácido maleico numa balança analítica e adicionaram-se 500 µL de solução padrão de DSS com uma seringa.

### 2.4.4. Soluções dos produtos das *smartshops* sem PI

Para a preparação destas soluções, pesou-se numa balança analítica cerca de 10 mg de cada produto adquirido nas *smartshops* diretamente para frascos de vidro bem identificados (**Tabela 2.1**). De seguida adicionou-se a cada frasco 500 µL de água deuterada (D<sub>2</sub>O) com uma seringa.

## 2.4.5. Soluções dos produtos das *smartshops* com PI

### Soluções de 20 mg.mL<sup>-1</sup> de amostra:

Numa balança analítica foram pesados cerca de 10 mg de cada produto adquirido nas *smartshops* diretamente para frascos de vidro bem identificados. De seguida adicionou-se a cada um dos frascos 500 µL de solução padrão de ácido maleico (10,34 mg.mL<sup>-1</sup>). Com uma seringa de 500 µL transferiu-se o conteúdo dos frascos de vidro para vários tubos de RMN devidamente identificados (**Tabela 2.1**).

### Soluções de 4 mg.mL<sup>-1</sup> de amostra:

Para cada uma das soluções amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup> dos produtos Blast01, Bliss02 e Blow04, com uma seringa de 500 µL, foram retirados 100 µL da solução para um tubo de RMN e adicionaram-se 400 µL de água deuterada.

### Soluções de 2 mg.mL<sup>-1</sup> de amostra:

Para cada uma das soluções de 20 mg.mL<sup>-1</sup> dos produtos Blast01, Bliss02 e Blow04, com uma seringa de 500 µL, foram retirados 100 µL de solução para um frasco de vidro e adicionaram-se 900 µL de água deuterada. Posteriormente retiram-se com uma 500 µL do frasco de vidro para um tubo de RMN.

## 2.5. Desenvolvimento da metodologia de qRMN <sup>1</sup>H

Para o desenvolvimento da metodologia de qRMN <sup>1</sup>H foi necessário: (i) obter os espectros de RMN <sup>1</sup>H das soluções padrão de ácido maleico, da solução padrão de DSS, da solução de ácido maleico com DSS, e das soluções dos produtos das *smartshops* (sem PI) em água deuterada nas condições instrumentais #1 (ver ponto 2.1); (ii) obter os espectros de RMN <sup>1</sup>H das soluções dos produtos das *smartshops* em água deuterada com ácido maleico (PI) nas condições instrumentais #1; (iii) realizar a experiência **T1 RMN** (condições instrumentais #2, ver ponto 2.1) com as soluções de concentração 20 mg.mL<sup>-1</sup> nas amostras dos produtos Blast01, Bliss02 e Blow04 em água deuterada com PI para calcular o tempo de relaxação dos prótons do ácido maleico (PI) e das catinonas fletedrona (**2.1**), metedrona (**2.2**) e 4-MEC (**2.3**). Estas experiências permitiram definir as condições instrumentais do RMN a utilizar na quantificação das catinonas.

## 2.6. Cálculo das incertezas

A incerteza de medição é definida no Vocabulário Internacional da Metrologia (VIM) [58] como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas”. Segundo o VIM, a mensuranda é a grandeza que se pretende medir. Explicar a mensuranda envolve a descrição do estado do fenómeno, corpo ou substância de que a grandeza é uma propriedade, incluindo qualquer componente relevante e as entidades químicas envolvidas. A medição, incluindo o sistema de medição e as condições nas quais a medição é efetuada, pode alterar o fenómeno, corpo ou substância, e como tal, este também deve ser bem definido [58,59].

### Repetibilidade da integração dos sinais nos espectros de RMN de $^1\text{H}$ :

Para estimar a repetibilidade (i. e., precisão de medições obtidas nas mesmas condições ambientais e operacionais) da integração dos sinais de próton foram obtidos 10 espectros de qRMN  $^1\text{H}$ , em condições de repetibilidade, para cada solução de concentração 20  $\text{mg.mL}^{-1}$ , 4  $\text{mg.mL}^{-1}$  e 2  $\text{mg.mL}^{-1}$  dos produtos Blast01, Bliss02 e Blow04 nas seguintes condições instrumentais: usou-se um programa de pulso zg90° com uma acumulação de 16 scans, um tempo de recuperação de 35s de duração, uma largura espectral de 12 ppm e uma resolução digital de 10 pontos/Hz.

### Repetibilidade das pesagens:

Para encontrar a repetibilidade da balança analítica, pesou-se um 10 vezes um gobelé e registaram-se as respetivas massas. De seguida calculou-se a média e o desvio padrão.

### Repetibilidade dos volumes medidos pela Seringa de 500 $\mu\text{L}$ :

Colocou-se, na balança analítica *Mettler ToledoPR11203*, um gobelé vazio e tarou-se a balança. Utilizando a seringa, adicionou-se um volume de 500  $\mu\text{L}$  de água destilada ao gobelé, registou-se a massa e repetiu-se o processo mais nove vezes. Depois de concluir as pesagens calculou-se a diferença de massas consecutivas e por fim, foram calculados a média e o desvio padrão das massas de água medidas pela seringa.

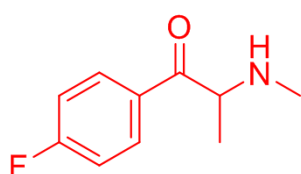
## 2.7. Quantificação da Flefedrona, Metedrona e 4-MEC nos produtos das *Smartshops*

Para quantificar as catinonas flefedrona (**2.1**), metedrona (**2.2**) e 4-MEC (**2.3**) nos produtos das *smartshops* foram obtidos espectros de qRMN  $^1\text{H}$  das soluções de 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  das amostras Blast01, Blast22, Bliss02, Bliss25, Bliss26, Bloom03, Bloom28, Blow04, Blow29, Blow30 e Bloom27 nas condições de quantificação descritas no ponto anterior (**2.6**). Os espectros de qRMN  $^1\text{H}$  são apresentados nos **Anexos 1**.

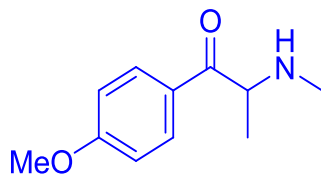


### 3.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS

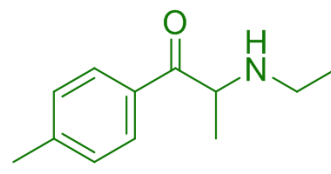
Neste trabalho desenvolveu-se e validou-se uma metodologia de quantificação das catinonas flefedrona (**3.1**), metedrona (**3.2**) e 4-MEC (**3.3**), em produtos comercializados em *smartshops* de Portugal, por RMN de  $^1\text{H}$ .



**3.1** – Flefedrona



**3.2** – Metedrona



**3.3** – 4-MEC

#### 3.1. Desenvolvimento da metodologia

A identificação e o doseamento das catinonas apresentado na literatura é usualmente realizado pela técnica destrutiva GC-MS <sup>[47,48]</sup>. No entanto, para que esta técnica seja utilizada é necessário que estejam disponíveis padrões dos analitos, o que nem sempre é possível. O caso das catinonas é especialmente crítico neste ponto porque os seus padrões são muito dispendiosos ou inexistentes. Assim, neste trabalho foi escolhida a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  para a quantificação catinonas flefedrona (**3.1**), metedrona (**3.2**) e 4-MEC (**3.3**), por esta técnica não ser destrutiva, e permitir a identificação e quantificação das substâncias na ausência de padrões do analito estudado.

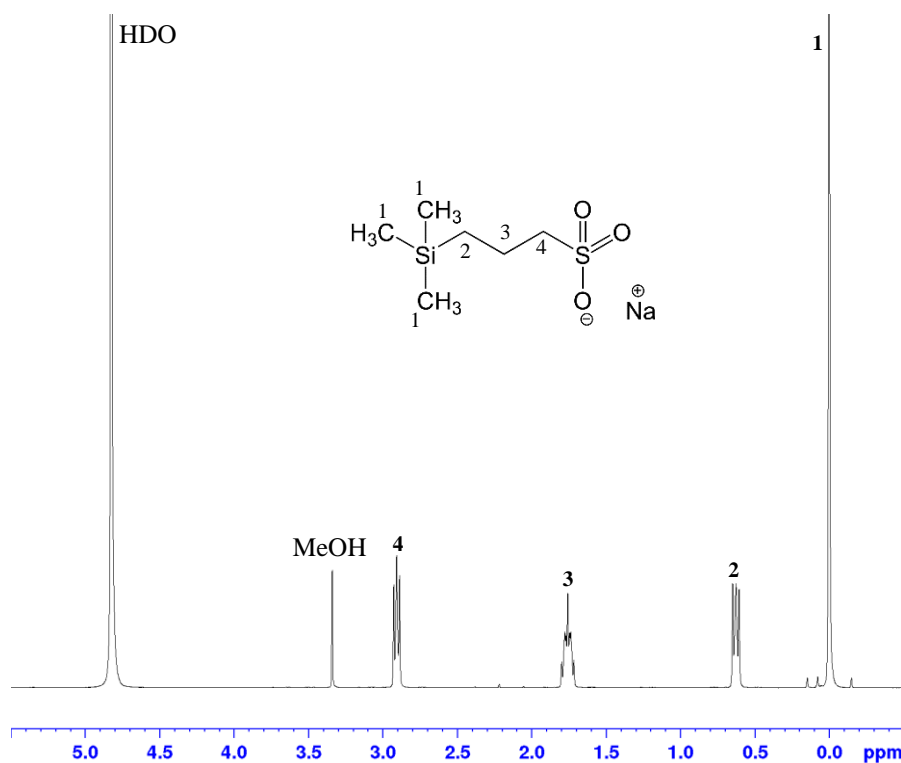
A quantificação através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  é normalmente realizada pelo método de adição padrão em que a referência da medição refere-se a um composto diferente do analito cuja quantidade é conhecida com uma incerteza reduzida. Nesta técnica a quantidade de analito é determinada em relação a uma quantidade conhecida do composto padrão, e recorrendo a um único espectro de RMN de  $^1\text{H}$  que apresenta sinais do analito e do padrão interno. Desta forma, esta metodologia torna possível o doseamento de compostos mesmo na ausência de padrões dos analitos que se pretende quantificar. Para a quantificação é necessário um padrão interno de pureza conhecida, que contenha o núcleo de interesse (neste caso protões) com uma ressonância que não se sobreponha ao(s) sinai(s) do analito ou outros componentes da amostra. O mesmo padrão interno pode ser usado para doseamento simultâneo de vários analitos. Os requisitos adicionais que o padrão interno deve ter para ser utilizado, são a não reatividade com os

componentes da amostra, baixa volatilidade, uma solubilidade semelhante à do(s) analito(s) e um tempo de relaxação suficientemente baixo [42-44,49]. Como as catinonas estudadas são vendidas sobre a forma de cloridrato e, por isso, são solúveis em água, selecionamos a água deuterada (D<sub>2</sub>O) como solvente da amostra e escolhemos o DSS sobre a forma de sal e o ácido maleico (AM) para serem usados como possíveis padrões internos. Tanto o DSS como o AM são solúveis em água, são quimicamente inertes para as amostras analisadas, têm baixa volatilidade e um tempo de relaxação relativamente baixo (T<sub>1</sub> do DSS ~2,6s e T<sub>1</sub> do AM ~4,9s).

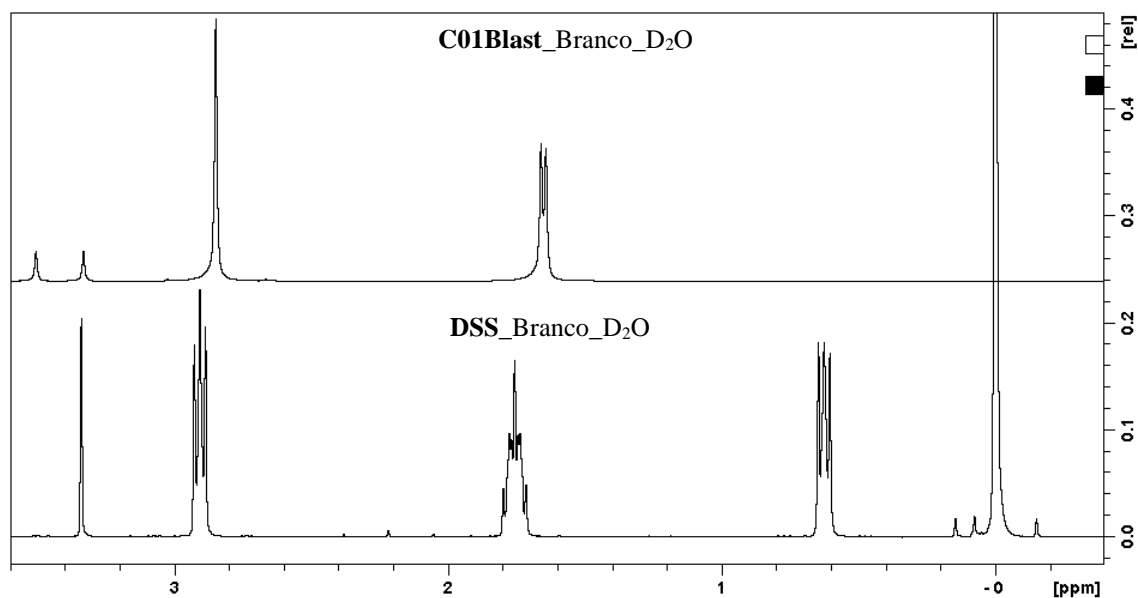
### 3.1.1. Escolha do padrão interno (PI)

A escolha do melhor padrão interno a utilizar na quantificação das catinonas flefedrona (**3.1**), metedrona (**3.2**) e 4-MEC (**3.3**), presentes nos produtos das *smartshops* foi efetuada por comparação entre os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das soluções padrão de ácido maleico e do DSS com os espectros das soluções dos produtos das *smartshops* (sem PI). Esta análise foi usada para verificar que não existem sinais nas amostras na zona do(s) pico(s) do padrão interno e desta forma assegurar que os sinais usados na quantificação são apenas resultantes do PI e da catinona em estudo.

O uso do DSS como padrão interno não passou este escrutínio pois como podemos observar no espectro de RMN <sup>1</sup>H do DSS em água deuterada (**Figura 3.1**) este contém vários picos com desvio químico entre δ0 e 3,5 ppm, alguns dos quais sobreponíveis aos sinais dos prótons das amostras em estudo (como por exemplo o Blast01 na **Figura 3.2**).

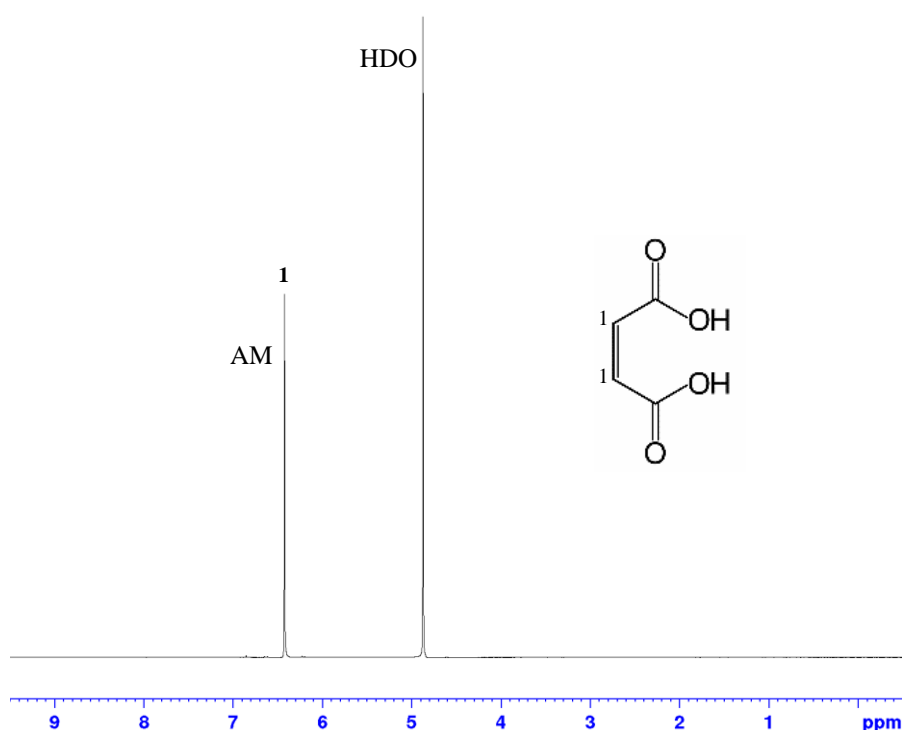


**Figura 3.1** – Ampliação do espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400 MHz de uma solução de DSS em  $\text{D}_2\text{O}$  com uma concentração de  $11,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons do DSS.

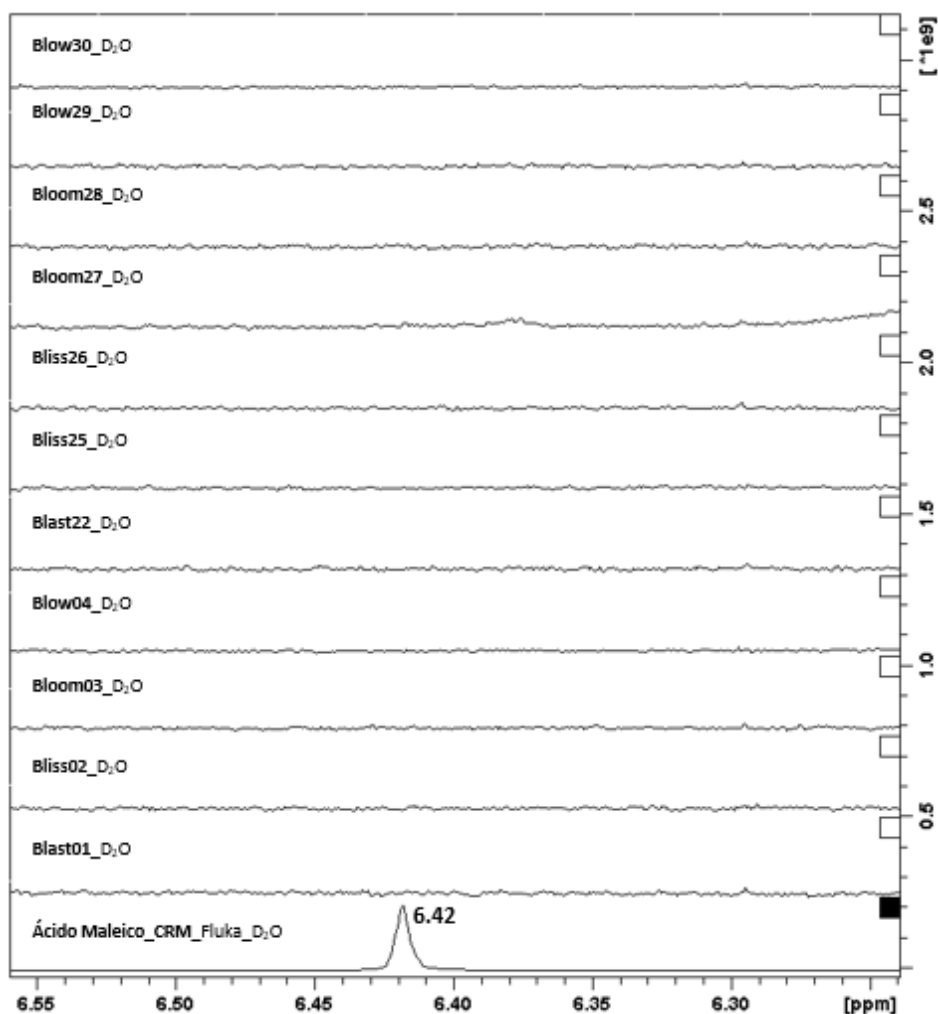


**Figura 3.2** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , a 400 MHz, do DSS ( $11,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e da amostra Balst01 ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Pelo contrário, o ácido maleico apresenta apenas um sinal a  $\delta 6,42$  ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 3.3**) que não é sobreponível a nenhum dos sinais das amostras, como se pode observar na **Figura 3.4**. Desta forma, este composto foi usado como padrão interno. É de salientar, que a imagem dos espectros das soluções dos produtos das *smartshops* (sem PI) está ampliada 2048 vezes em comparação com o espectro do ácido maleico, o que reforça a indicação que o ácido maleico é um padrão interno adequado para a quantificação destas catinonas nestes produtos. Esta avaliação deve ser efetuada em cada conjunto de novas amostras.



**Figura 3.3** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz, de  $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$  de ácido maleico em  $\text{D}_2\text{O}$ . A figura identifica os sinais dos prótons do AM.



**Figura 3.4** – Ampliação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) de soluções em  $\text{D}_2\text{O}$  das diversas amostras sem PI [Blast01\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Blast22\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss02\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss25\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Bliss26\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Blow04\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Blow29\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Blow30\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Bloom03\_  $\text{D}_2\text{O}$ , Bloom27\_  $\text{D}_2\text{O}$  e Bloom28\_  $\text{D}_2\text{O}$ ] e do ácido maleico [Ácido Maleico\_CRM\_Fluka\_  $\text{D}_2\text{O}$ ] na zona  $\delta$ 6,6-6,2ppm.

### 3.1.2. Identificação das catinonas

As catinonas flefedrona (**3.1**), metedrona (**3.2**) e 4-MEC (**3.3**) foram identificadas anteriormente nos produtos aqui estudados conjuntamente com outras substâncias psicoativas (**Tabela 3.1**), com base nos dados de GC-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) e nas experiências de RMN realizadas em metanol, no âmbito de trabalhos já desenvolvidos na FCUL <sup>[49,50]</sup>.

**Tabela 3.1** – Substâncias psicoativas identificadas nas amostras das *smartshops* [49,50]

Amostras	Substância
Blast01	<b>Flefedrona</b> ; Cafeína
Bliss02	<b>Metedrona</b>
Bloom03	Pentedrona; <b>Metedrona</b> ; N-Etilcatinona; Cafeína
Blow04	<b>4-MEC</b> ; MDPV; Cafeína
Blast22	<b>Flefedrona</b> ; Cafeína
Bliss25	Metedrona
Bliss26	<b>Metedrona</b> ; Pentedrona; 3,4-DMMC; Cafeína
Bloom27	Metilona; <b>4-MEC</b> ; Pentedrona
Bloom28	Pentedrona; <b>Metedrona</b> ; N-Etilcatinona; Cafeína
Blow29	<b>4-MEC</b> ; MDPV
Blow30	<b>4-MEC</b> ; MDPV; Cafeína

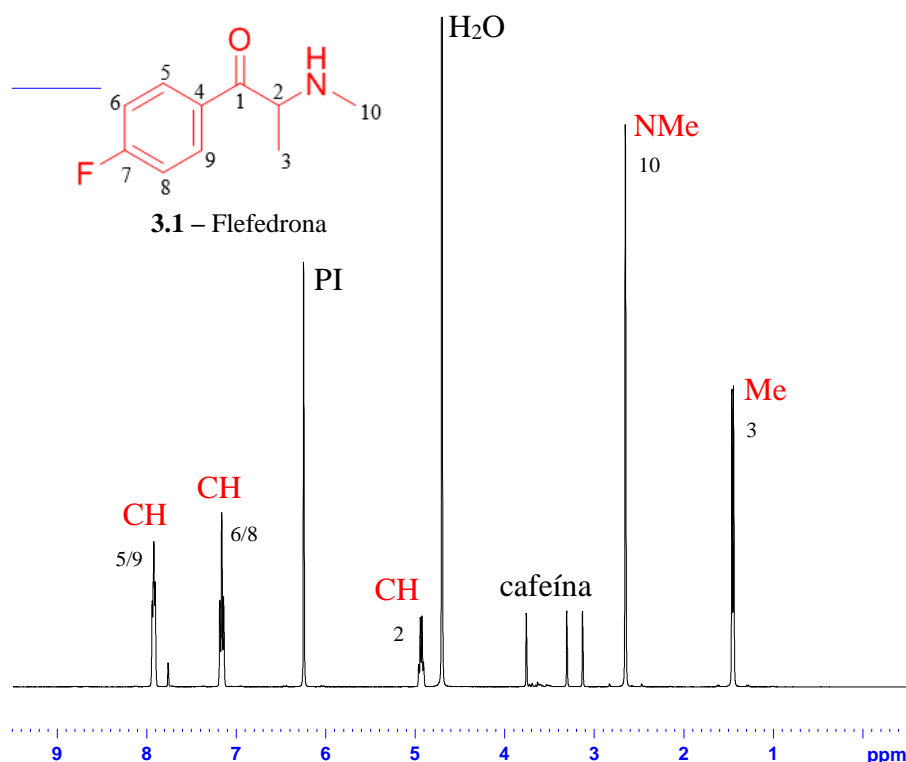
Neste trabalho a identificação das catinonas flefedrona (3.1), metedrona (3.2) e 4-MEC (3.3) nos produtos estudados foi efetuada por comparação dos sinais obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras em água deuterada (**Figuras 3.5, 3.7 e 3.9**) com os dados anteriores em metanol deuterado (**Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4**) [49].

### Identificação da Flefedrona:

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Blast01 (**Figura 3.5**) é possível identificarmos os vários sinais correspondentes a flefedrona (3.1) a  $\delta$  (ppm):

- 1,63d (3H) atribuível ao grupo metilo (posição 3) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o próton em posição 2;
- 2,83s (3H) característico de um grupo metilo ligado ao nitrogénio (posição 10);
- 5,11q (1H) atribuível ao próton (posição 2) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o grupo metilo na posição 3;
- Os sinais a 7,33t (2H,  $J_{m,o}=8,7$  Hz,  $J_{m,F}=8,7$  Hz) e a 8,09dd (2H,  $J_{o,m}=8,7$  Hz,  $J_{o,F}=5,4$  Hz) característicos dos prótons de um anel benzénico 1,4 dissustituído, correspondente aos prótons *meta* (posição 6 e 8) e *orto* (posição 5 e 9) respetivamente do anel aromático, ambos os sinais apresentam uma constante de 8,7 Hz correspondente ao acoplamento vicinal entre prótons em posição *orto* e *meta*, e um acoplamento com o átomo de fluor ( $^{19}\text{F}$ ) em posição *para* (com uma

constante  $^3J$  de 8,7 Hz entre  $^{19}\text{F}$  e os prótons *meta* superior à constante  $^4J$  entre  $^{19}\text{F}$  e os prótons *orto* de 5,4 Hz).

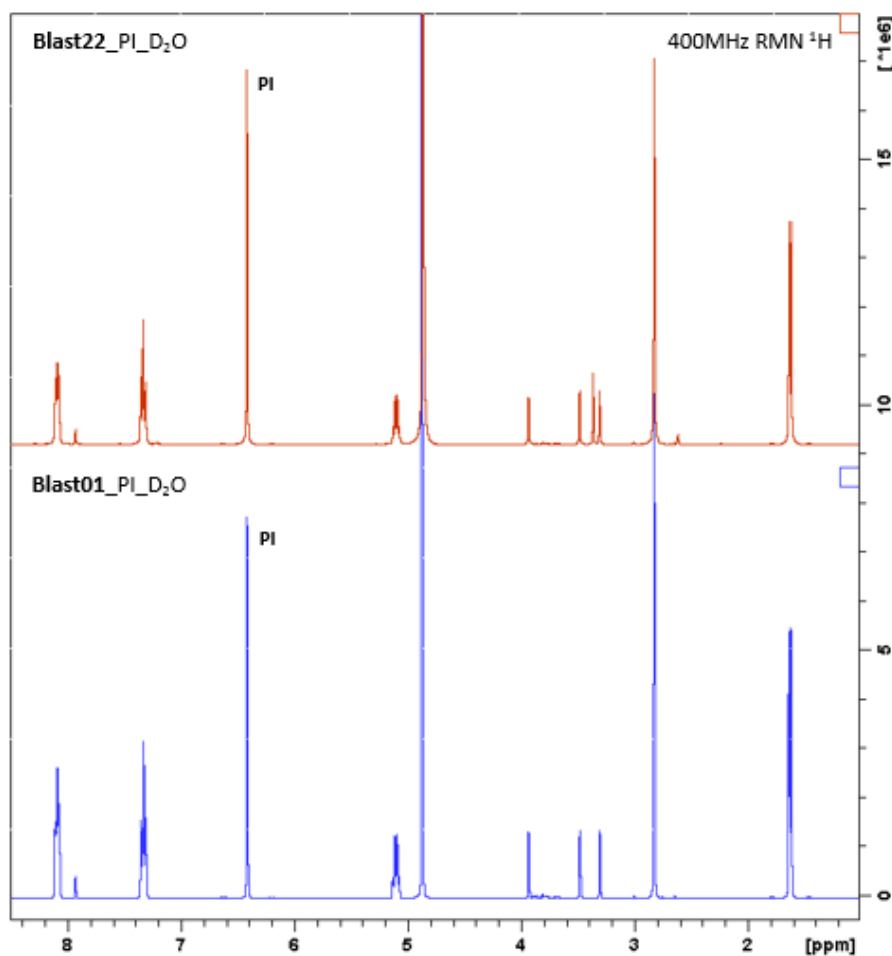


**Figura 3.5** – Espectro RMN  $^1\text{H}$  do Blast01 (20 mg.mL $^{-1}$ ) a 400MHz com um teor de ácido maleico de (Padrão interno) 10,34 mg.mL $^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da flefedrona (3.1).

A **Tabela 3.2** representa os desvios químicos e a multiplicidade dos sinais da flefedrona nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções das amostras de Blast01 em MeOD [49,50], e Blast01 e Blast22 ambas em D<sub>2</sub>O (**Figura 3.6**). Verifica-se que os desvios químicos da flefedrona nas soluções amostra Blast01 e Blast22 em D<sub>2</sub>O diferem dos desvios químicos na solução Blast01 em MeOD [49,50] desvio devido à mudança de solvente.

**Tabela 3.2** – Desvios químicos, multiplicidade e constante de acoplamento da flefedrona (3.1) para os vários espectros RMN  $^1\text{H}$  de soluções de Blast01 e Blast22 preparados em D<sub>2</sub>O e para o Blast01 preparado em MeOD [49,50] e D<sub>2</sub>O.

Amostra	Solvente	$\delta_{\text{H}3}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}10}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}2}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}6/\text{H}8}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}5/\text{H}9}$ , m, $J(\text{Hz})$
Blast01	MeOD	1,61d; 7,2	2,81s	5,16q; 7,2	7,34t; 8,7	8,17dd; 5,4; 8,7
Blast01	D <sub>2</sub> O	1,63d; 7,2	2,83s	5,11q; 7,2	7,33t; 8,7	8,09dd; 5,4; 8,7
Blast22	D <sub>2</sub> O	1,63d; 7,2	2,83s	5,10q; 7,2	7,33t; 8,7	8,09dd; 5,4; 8,7



**Figura 3.6** – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  das soluções amostras Blast22 e Blast01 (Blast22\_PI\_D $_2$ O e Blast01\_PI\_D $_2$ O) com concentração de 20 mg.mL $^{-1}$  preparada em D $_2$ O, que contém a catinona felfedrona (3.1). Estas soluções têm um teor de ácido maleico (PI) de 10,34 mg.mL $^{-1}$ .

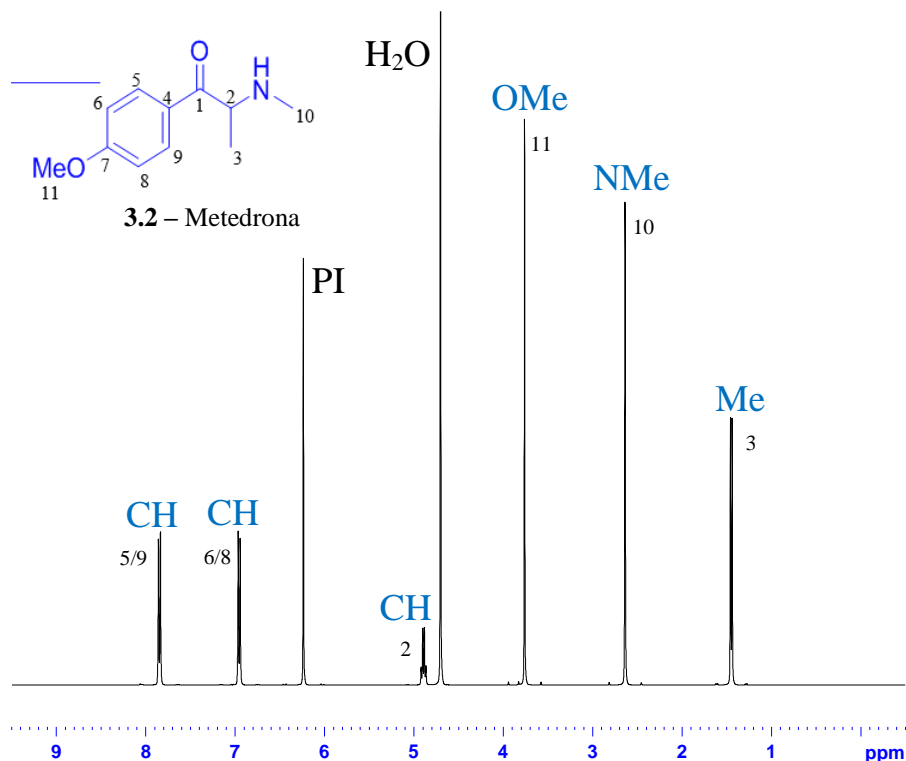
### Identificação da Metedrona:

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Bliss02 (**Figura 3.6**) é possível identificarmos os vários sinais da metedrona (3.2):

- 1,63d (3H) atribuível ao grupo metilo (posição 3) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o próton em posição 2;
- 2,82s (3H) característico de um grupo metilo ligado ao nitrogénio (posição 10);
- 3,94s (3H) característico de um grupo metoxilo (posição 11)
- 5,07q (1H) atribuível ao próton (posição 2) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o grupo metilo na posição 3;
- Os sinais a 7,14d (2H,  $J_{m,o}=8,8$  Hz) e a 8,03d (2H,  $J_{o,m}=8,8$  Hz) característicos dos prótons de um anel benzénico 1,4 dissustituído, correspondente aos prótons *meta* (posição 6 e 8) e *orto* (posição 5 e 9) respetivamente do anel aromático, ambos os



sinais apresentam uma constante de 8,8 Hz correspondente ao acoplamento vicinal entre prótons em posição *orto* e *meta*.

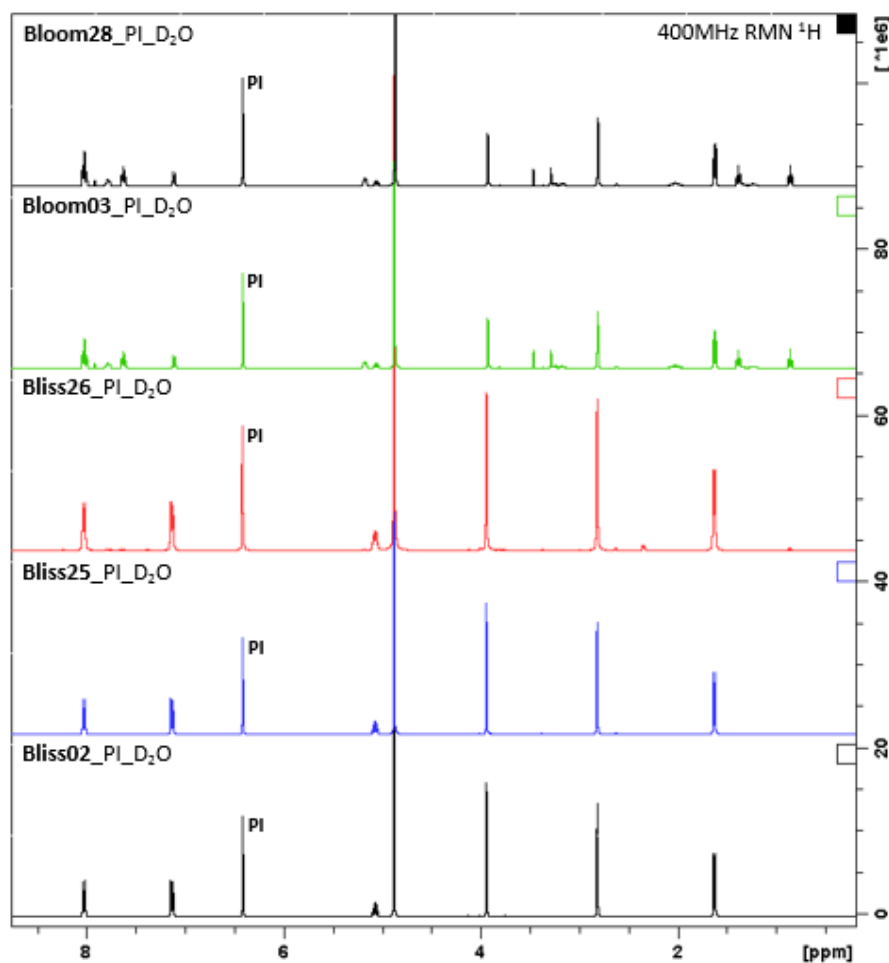


**Figura 3.7** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz, da solução amostra Bliss02 (20 mg.mL $^{-1}$ ) com um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL $^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da metedrona (3.2).

A **Tabela 3.3** representa os desvios químicos e a multiplicidade dos sinais da metedrona (3.2) nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das soluções amostras de Bliss02 em MeOD [49,50], e Bliss02, Bliss25, Bliss26, Bloom03 e Bloom28 em D $_2$ O (**Figura 3.8**). Nota-se que os desvios químicos das soluções amostra preparadas em água deuterada relativamente ao Bliss02 em MeOD [49,50] apresentam uma ligeira diferença devido à mudança de solvente.

**Tabela 3.3** – Desvio químico, multiplicidade e constante de acoplamento da metedrona (3.2) de espectros RMN  $^1\text{H}$  de diversas amostras preparadas em D $_2$ O ou MeOD [49,50].

Amostra	Solvente	$\delta_{\text{H}3}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}10}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}11}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}2}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}5/\text{H}9}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}6/\text{H}8}$ , m, $J(\text{Hz})$
Bliss02	MeOD	1,59d; 7,2	2,77s	3,90s	5,11q; 7,2	8,05d; 8,9	7,09d; 8,9
Bliss02	D $_2$ O	1,63d; 7,2	2,82s	3,94s	5,07q, 7,2	8,03d, 8,9	7,14d; 8,9
Bliss25	D $_2$ O	1,63d; 7,2	2,82s	3,94s	5,07q, 7,2	8,03d, 8,9	7,14d; 8,9
Bliss26	D $_2$ O	1,63d; 7,2	2,82s	3,94s	5,07q, 7,2	8,03d, 8,9	7,14d; 8,9
Bloom03	D $_2$ O	1,63d; 7,2	2,82s	3,93s	5,07q, 7,2	8,03d, 8,9	7,12d; 8,9
Bloom28	D $_2$ O	1,62d; 7,2	2,81s	3,93s	5,06q; 7,2	8,03d, 8,9	7,12d; 8,9



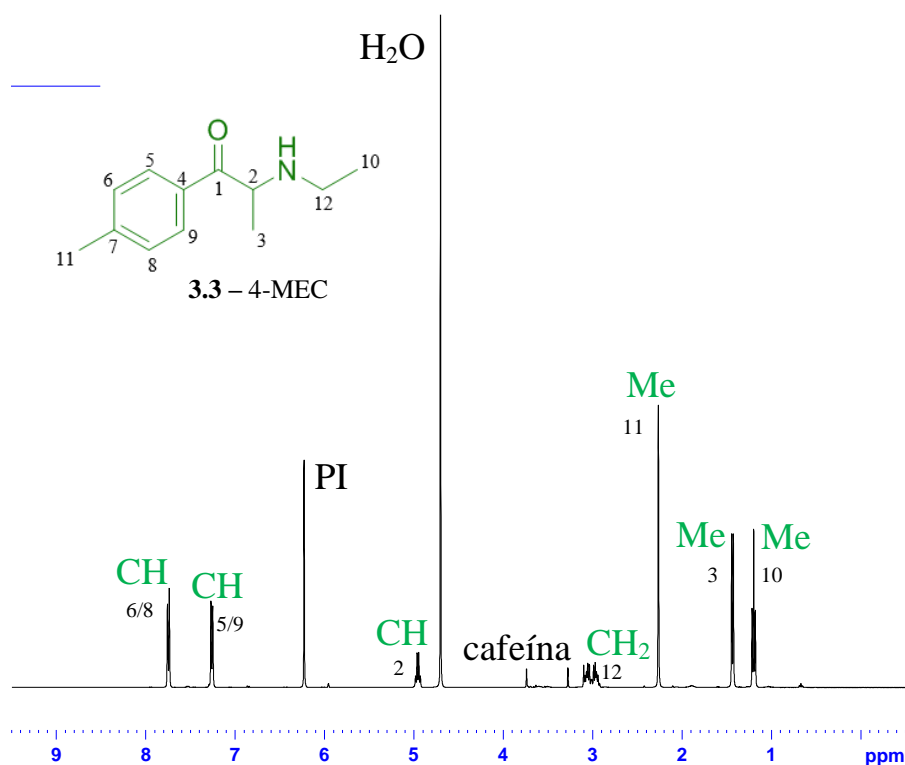
**Figura 3.8** – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de soluções amostra preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com ácido maleico (PI) ( $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Estas amostras contêm a catinona metedrona (**3.2**).

### Identificação da 4-MEC:

Analisando o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do Blow04 (**Figura 3.9**) é possível identificarmos os vários sinais da 4-MEC (**3.3**):

- 1,39t (3H) característico de um grupo metilo (posição 10) ligado a um  $\text{CH}_2$  com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz.
- 1,63d (3H) atribuível ao grupo metilo (posição 3) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o próton em posição 2;
- 3,21m (2H) característico de um  $\text{CH}_2$  (posição 12) ligado a um metilo (posição 10);
- 5,14q (1H) atribuível ao próton (posição 2) ligado ao carbono  $\alpha$  do carbonilo com uma constante de acoplamento vicinal de 7,2 Hz com o grupo metilo na posição 3;
- Os sinais a 7,45d (2H,  $J_{m,o}=8,8 \text{ Hz}$ ) e a 7,94d (2H,  $J_{o,m}=8,8 \text{ Hz}$ ) característicos dos prótons de um anel benzênico 1,4 dissustituído, correspondente aos prótons *meta*

(posição 6 e 8) e *orto* (posição 5 e 9) respectivamente do anel aromático. Ambos os sinais apresentam uma constante de 8,8 Hz correspondente ao acoplamento vicinal entre prótons em posição *orto* e *meta*.

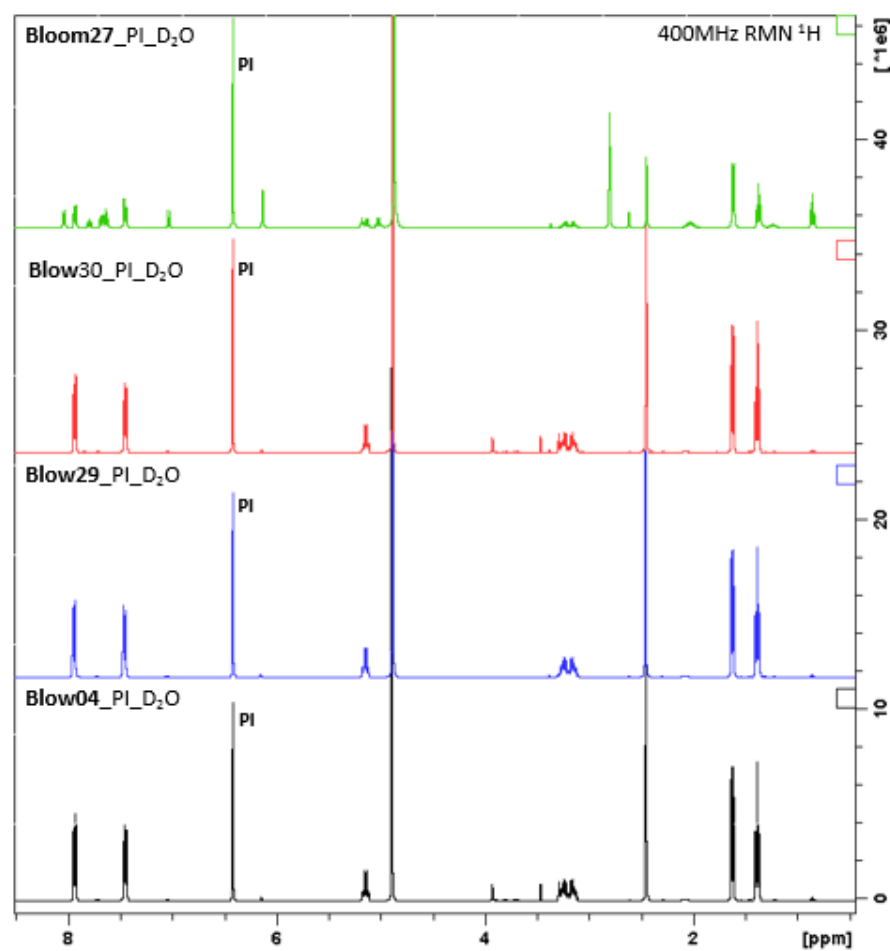


**Figura 3.9** – Espectro RMN  $^1\text{H}$  da solução amostra Blow04 (20 mg.mL $^{-1}$ ) a 400MHz com um teor de padrão interno ácido maleico 10,34 mg.mL $^{-1}$ . A figura identifica os sinais dos prótons da 4-MEC (3.3).

A **Tabela 3.4** representa os desvios químicos e a multiplicidade dos sinais da 4-MEC (3.3) nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de Bliss04 em MeOD <sup>[49,50]</sup>, Blow04, Blow29, Blow30 e Bloom27 todas em D $_2$ O (**Figura3.10**). É possível observar diferenças entre os desvios químicos das soluções amostra em água deuterada relativamente ao Blow04 em metanol deuterado <sup>[49,50]</sup> devido à mudança de solvente.

**Tabela 3.4** – Desvio químico, multiplicidade e constante de acoplamento da 4-MEC (3.3) para várias soluções amostra preparadas em MeOD <sup>[49,50]</sup> e D $_2$ O.

Amostra	Solvente	$\delta_{\text{H}3}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}10}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}11}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}2}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}5/\text{H}9}$ , m, $J(\text{Hz})$	$\delta_{\text{H}6/\text{H}8}$ , m, $J(\text{Hz})$
Blow04	MeOD	1,59d; 7,2	1,37t; 7,2	2,45s	5,17q; 7,2	7,98d; 8,1	7,41d; 8,1
Blow04	D $_2$ O	1,63d; 7,2	1,39t; 7,2	2,45s	5,14q; 7,2	7,94d; 8,0	7,45d; 8,0
Blow29	D $_2$ O	1,62d; 7,2	1,37t; 7,2	2,46s	5,15q; 7,2	7,94d; 8,0	7,46d; 8,0
Blow30	D $_2$ O	1,63d; 7,2	1,39t; 7,2	2,45s	5,14q; 7,2	7,93d; 8,0	7,45d; 8,0
Bloom27	D $_2$ O	1,62d; 7,2	1,38t; 7,2	2,45s	5,14q; 7,2	7,93d; 8,0	7,45d; 8,0



**Figura 3.10** – Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de soluções amostra de Blow e Bloom preparadas em  $\text{D}_2\text{O}$  ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) com ácido maleico (PI) ( $10,34 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As soluções amostra contêm a catinona 4-MEC (**3.3**).

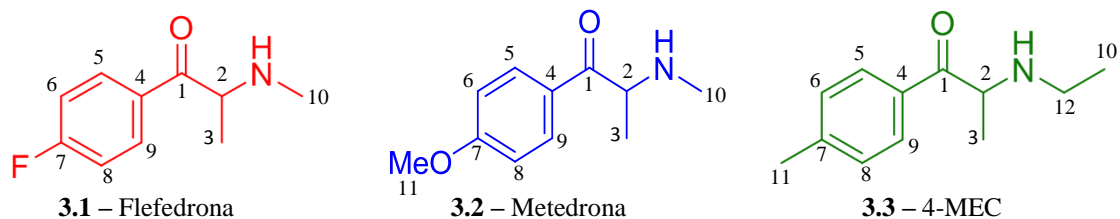
#### Repetibilidade dos desvios químicos:

No **Anexo 2** são apresentados os desvios químicos das 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, dos sinais de ressonância da flefedrona (**3.1**), metedrona, (**3.2**), e 4-MEC (**3.3**) dos espectros de qRMN  $^1\text{H}$  das soluções amostra Blast01, Bliss02 e Blow04 para cada concentração ( $20 \text{ mg.mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) que mostram que para todas as catinonas os diferentes valores de ressonância para cada sinal se mantêm constantes.

### 3.1.3. Determinação do tempo de relaxação $T_1$

Após identificação dos sinais das catinonas flefedrona (**2.1**), metedrona (**2.2**) e 4-ME (**2.3**), nos vários produtos das *smartshops* foi necessário determinar o tempo de relaxação ( $T_1$ ) dos prótons das 3 catinonas bem como o do ácido maleico, uma vez que se deve assegurar na qRMN  $^1\text{H}$  que todos os prótons relaxam antes de se aplicar um novo

pulso, para garantir que a integração seja proporcional ao número de moles dos prótons que originam o sinal de ressonância. Estes tempos foram calculados para as amostras Blast01, Bliss02 e Blow04 (nas condições instrumentais #2, ver ponto 2.1 da parte experimental) pois eram as amostras que tínhamos mais quantidades e que apresentavam as 3 catinonas em maior percentagem. A **Tabela 3.5** apresenta os tempos de relaxação estimados.



**Tabela 3.5** – Tempos de relaxação T<sub>1</sub> (s) para os prótons das 3 catinona e do ácido maleico.

Amostra	Catinona	T <sub>1</sub> <sub>PI</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H3</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H10</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H11</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H2</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H5/H9</sub>	T <sub>1</sub> <sub>H6/H8</sub>
Blast01	Flefedrona	5,91	1,32	1,89	-	1,38	2,20	3,71
Bliss02	Metedrona	4,88	< 1	1,40	1,08	1,48	1,30	1,70
Blow04	4-MEC	5,00	< 1	< 1	< 1	< 1	1,54	1,54

A partir do valor de T<sub>1</sub> calculou-se o tempo de recuperação (*delay*) entre pulsos consecutivos. O *delay* para efeitos de quantificação tem de ser maior que 5 vezes o tempo de relaxação ( $D1 > 5 \times T_1$ ). Foi utilizado um tempo de recuperação de 35 s nas experiências de qRMN de próton deste trabalho.

## 3.2. Quantificação

A partir dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das amostras de Blast01, Bliss02 e Blow04 obtidos em condições instrumentais adequadas a de quantificações (qRMN), é possível determinar a quantidade de catinona presente em cada amostra através da equação (2). Esta equação baseia-se no facto da integração da área de um sinal de ressonância ser diretamente proporcional ao número de prótons que originam esse sinal.

$$\frac{I_{CAT}}{I_{PI}} = \frac{n_{CAT}}{n_{PI}} \times \frac{n_{CAT}^H}{n_{PI}^H} \quad (2)$$

onde  $I_{CAT}$  e  $I_{PI}$  representam as áreas dos picos dos sinais de ressonância da catinona e do padrão interno,  $n_{CAT}$  e  $n_{PI}$  representam o número de moles da catinona e do padrão interno

presente na solução amostra e,  $n_{PI}^H$  e  $n_{CAT}^H$  representam, o número de prótons do padrão interno e da catinona que dão origem aos sinais de ressonância respetivamente [46].

Substituindo na equação (2) o número de moles pelo quociente entre a massa (m) pesada e a massa molar (M) de cada composto, obtém-se seguinte equação:

$$\frac{m_{CAT} \times n_{CAT}^H}{M_{CAT} \times I_{CAT}} = \frac{m_{PI} \times n_{PI}^H}{M_{PI} \times I_{PI}} \quad (3)$$

onde  $m_{CAT}$  é a massa da catinona,  $M_{CAT}$  a massa molar da catinona,  $m_{PI}$  a massa do padrão interno e  $M_{PI}$  a massa molar do padrão interno.

Para adaptarmos a equação (3) ao nosso procedimento experimental no qual em vez de se pesar diretamente o padrão interno (ácido maleico) para o tubo de RMN foi adicionado um volume  $V_2$  de uma solução padrão de ácido maleico de concentração  $C_{AM}^A$ , é necessário calcular a concentração da catinona através da equação (4) e a concentração do ácido maleico a partir da equação (5).

$$C_{CAT}^{T1} = \frac{m_{CAT}}{V_2 \times M_{CAT}} \quad (4)$$

$$C_{AM}^A = \frac{m_{AM}^W \times P_{AM}}{V_1 \times M_{AM}} \quad (5)$$

Onde,  $C_{CAT}^{T1}$  é a concentração da catinona no tubo de RMN,  $m_{CAT}$  a massa estimada de catinona na amostra,  $V_2$  o volume final da solução de catinona,  $M_{CAT}$  a massa molar da catinona,  $C_{AM}^A$  a concentração da solução padrão de ácido maleico,  $m_{AM}^W$  a massa pesada de ácido maleico para fazer a solução padrão,  $P_{AM}$  a pureza do ácido maleico,  $V_1$  o volume total da solução padrão de ácido maleico e  $M_{AM}$  a massa molar de ácido maleico.

Substituindo  $n_{CAT}$  e  $n_{PI}$  na equação (3) em função da concentração dadas pelas equações (4) e (5) respetivamente, e reordenando, obtém-se a equação (6) que nos permite estimar a quantidade de catinona em cada amostra.

$$\begin{aligned} \frac{C_{CAT}^{T1} \times n_{CAT}^H \times V_2}{I_{CAT}} &= \frac{C_{AM}^A \times n_{AM}^H \times V_2}{I_{AM}} \Leftrightarrow \frac{C_{CAT}^{T1} \times n_{CAT}^H}{I_{CAT}} = \frac{C_{AM}^A \times n_{AM}^H}{I_{AM}} \Leftrightarrow \\ &\Leftrightarrow m_{CAT} = \frac{I_{CAT}}{I_{AM}} \times \frac{n_{AM}^H}{n_{CAT}^H} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{M_{CAT}}{M_{AM}} \times m_{AM}^W \times P_{AM} \quad (6) \end{aligned}$$

Dividindo a expressão anterior pela massa pesada de cada amostra ( $m_{amostra}^W$ ) obtém-se a equação geral (7) que nos permite calcular a fração mássica das catinonas, nas amostras, dos produtos comercializados em *smartshops*.

$$W_{CAT} = \frac{I_{CAT}}{I_{AM}} \times \frac{n_{AM}^H}{n_{CAT}^H} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{M_{CAT}}{M_{AM}} \times \frac{m_{AM}^W}{m_{amostra}^W} \times P_{AM} \quad (7)$$

Os sinais de cada catinona ( $I_{CAT}$ ), utilizados nesta equação, foram obtidos a partir do espectro de qRMN  $^1\text{H}$  normalizado para 100 o valor da área do sinal do ácido maleico ao desvio químico de 6,42 ppm. Foram obtidos 90 espectros de qRMN de  $^1\text{H}$  a partir das soluções amostra Blast01, Bliss02 e Blow04 (30 espectros por amostra). O **Anexo 3** apresenta as áreas normalizadas obtidas para cada sinal das várias catinonas quantificadas nesses espectros. Para determinar as áreas de cada sinal de ressonância foi definido um intervalo de desvio químico que exclui a sobreposição de outros sinais. Os intervalos definidos são apresentados no início do **Anexo 3**.

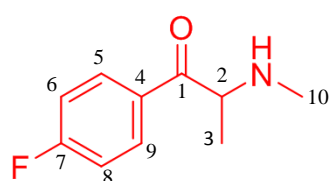
A **Tabela 3.6** apresenta a aplicação da equação (7) às 3 catinonas estudadas: flefedrona (3.1), metedrona (3.2) e 4-MEC (3.3). Estas equações só não indicam os valores das variáveis que diferem com o sinal de próton e com a réplica do espectro considerada.

**Tabela 3.6** – Equações usadas para calcular a fração mássica da flefedrona (3.1), metedrona (3.2) e 4-MEC (3.3).

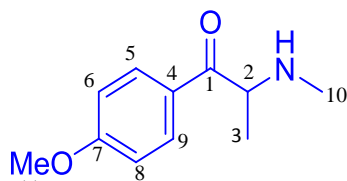
Amostras	Catinona	Equação <sup>1</sup>
Blast01	Flefedrona	$W_{FLE} = \frac{I_{FLE}}{100} \times \frac{2}{n_{FLE}^H} \times \frac{0,5}{10} \times \frac{217,66}{116,07} \times \frac{0,1034}{0,0105} \times 0,9999$
Bliss02	Metedrona	$W_{MET} = \frac{I_{MET}}{100} \times \frac{2}{n_{MET}^H} \times \frac{0,5}{10} \times \frac{229,66}{116,07} \times \frac{0,1034}{0,0101} \times 0,9999$
Blow04	4-MEC	$W_{4-MEC} = \frac{I_{4-MEC}}{100} \times \frac{2}{n_{4-MEC}^H} \times \frac{0,5}{10} \times \frac{227,76}{116,07} \times \frac{0,1034}{0,0111} \times 0,9999$

<sup>1</sup>valores substituídos em cada expressão:  $P_{AM}$  (0,9999);  $V_2$  (0,5 mL);  $V_1$  (10 mL);  $M_{AM}$  (116,07 g.mol<sup>-1</sup>);  $M_{FLEFEDRONA}$  (217,66 g.mol<sup>-1</sup>);  $M_{METEDRONA}$  (229,66 g.mol<sup>-1</sup>);  $M_{4-MEC}$  (227,76 g.mol<sup>-1</sup>);  $m_{AM}^W$  (0,1034 g);  $m_{BLAST01}^W$  (0,0105 g);  $m_{BLISS02}^W$  (0,0101 g);  $m_{BLOW04}^W$  (0,0111 g);  $n_{AM}^H$  (2);  $I_{AM}$  (100).

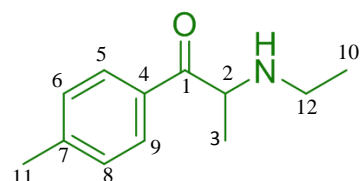
Nas Tabelas seguintes (3.7, 3.8 e 3.9) são apresentadas as frações mássicas estimadas das catinonas flefedrona (3.1), metedrona (3.2) e 4-MEC (3.3), nas amostras Blast01, Bliss02 e Blow04, em função do sinal de ressonância seletivo para cada catinona e considerando a concentração da amostra na solução medida.



**3.1 – Flefedrona**



**3.2 – Metedrona**



**3.3 – 4-MEC**

**Tabela 3.7** – Frações mássicas (%) estimadas de flefedrona no produto Blast01, em função dos sinais de ressonância da flefedrona para cada solução amostra de concentração em Blast01 (2, 4 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>).

Posição	H3	H10	H2	H6/H8	H5/H9
C	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>
(mg.mL <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	87,5	87,0	99,2	88,6	88,8
4	89,3	88,3	89,8	88,9	88,9
20	90,4	90,4	89,6	90,1	90,2

**Tabela 3.8** – Frações mássicas (%) estimadas de metedrona no produto Bliss02, em função dos sinais de ressonância da metedrona para cada solução amostra de concentração em Bliss02 (2, 4 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>).

Posição	H3	H10	H11	H2	H6/H8	H5/H9
C	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>
(mg.mL <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	96,78	95,47	95,43	99,57	96,54	96,64
4	97,43	96,07	95,89	98,52	96,48	96,61
20	97,27	97,28	96,63	96,56	96,68	96,82

**Tabela 3.9** – Frações mássicas (%) estimadas de 4-MEC no produto Blow04, em função dos sinais de ressonância da 4-MEC para cada solução amostra de concentração em Blow04 (2, 4 e 20 mg.mL<sup>-1</sup>).

Posição	H3	H10	H11	H2
C	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>	W <sub>CAT</sub>
(mg.mL <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(%)	(%)
2	91,74	91,61	91,50	96,71
4	91,41	91,15	91,23	94,13
20	91,41	91,32	91,33	92,67



### 3.3. Incertezas

Para que o resultado obtido através da equação (7) seja expresso com uma incerteza é necessário calcular a incerteza combinada da fração mássica  $u(W_{CAT})$ . Para o cálculo desta incerteza é preciso calcular todas as componentes de incerteza que afetam a medição. As fontes de incerteza a considerar são: (i) a incerteza da razão das integrações  $u\left(\frac{I_{CAT}}{I_{AM}}\right)$ , calculada através do desvio padrão da repetibilidade estimada a partir de 10 espectros; (ii) a incerteza associada aos volumes medidos; com uma micropipeta e uma seringa; (iii) a incerteza associada às massas estimadas por uma balança analítica; (iv) a incerteza associada às massas molares das catinonas (flefedrona, metedrona e 4-MEC) e do ácido maleico; (v) e da incerteza da pureza do ácido maleico. Para as soluções amostra com uma concentração de amostra  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  é necessário também calcular a incerteza associada ao fator de diluição ( $u(F_d)$ ) considerado.

#### 3.3.1. Incerteza da massa molar

Para calcular a incerteza associada às massas molares das catinonas sob a forma de clorohidratos e do ácido maleico, apresentadas na **Tabela 3.10**, utilizaram-se os valores das massas molares, e respetivas incertezas, de cada elemento químico referenciados pela IUPAC em 2011 <sup>[51]</sup>. As equações utilizadas para o cálculo destas componentes de incerteza são apresentados no **Anexo 4**.

**Tabela 3.10** – Valores das incertezas da massa molar.

Nome Químico	Estrutura Química	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Incerteza da Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )
Flefedrona	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> NOF.HCl	217,66	0,0074
Metedrona	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> .HCl	229,66	0,0076
4-MEC	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO.HCl	227,76	0,0076
Ácido Maleico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	116,07	0.0026

### 3.3.2. Incerteza associada às massas medidas

O valor da incerteza da pesagem é igual para todas as amostras e para o ácido maleico dado que foi usada a mesma balança analítica nas pesagens.

A incerteza associada à massa medida numa balança pode ser estimada pela combinação linear das seguintes componentes: a incerteza associada à calibração da balança ( $u_{Bal}^{Cal}$ ) e a incerteza associada à repetibilidade da balança ( $u_{Bal}^{Rep}$ ), equação (8) [52-55].

$$u_m = \sqrt{(u_{Bal}^{Cal})^2 + (u_{Bal}^{Rep})^2} \quad (8)$$

A incerteza associada à calibração da balança é calculada a partir da tolerância fornecida pelo fabricante, considerando uma distribuição retangular uniforme, como demonstra a equação (9).

$$u_{Bal}^{Cal} = \frac{\text{erro máximo de indicação}}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

A incerteza associada à repetibilidade da balança é calculada através do desvio padrão da repetibilidade (10).

$$u_{Bal}^{Rep} = \sigma_{repetibilidade} \quad (10)$$

Para que uma massa,  $m$ , estimada por diferença [ $m = (\text{massa bruta}) - (\text{massa da tara})$ ], as incertezas referidas anteriormente são contabilizadas duas vezes porque as duas medições de massa consideradas são independentes em termos de repetibilidade da pesagem e de linearidade da resposta da balança, equação (11) [52-55].

$$u_m = \sqrt{2(u_{Bal}^{Cal})^2 + 2(u_{Bal}^{Rep})^2} \quad (11)$$

O valor da incerteza associada às massas medidas é de  $1,58 \times 10^{-4}$ , os cálculos efetuados para determinar esta incerteza encontram-se no **Anexo 4**.

### 3.3.3. Incerteza associada a uma medição de volume (usando uma micropipeta ou seringa)

A incerteza associada a uma medição de volume,  $\mu_v$ , resulta da combinação de três componentes: a incerteza associada à calibração do material volumétrico ( $u_{Vol}^{Cal}$ ); a incerteza associada à repetibilidade da manipulação do material volumétrico ( $u_{Vol}^{Rep}$ ) e a incerteza associada ao efeito da temperatura ( $u_{Vol}^{Temp}$ ), caso esta não seja controlada, equação [52-54].

A incerteza associada à calibração de material volumétrico é estimada através da tolerância associada ao valor nominal do seu volume, fornecida pelo fabricante. Normalmente a tolerância é fornecida sem o nível de confiança e sem qualquer indicação da distribuição que lhe está associada. Nestes casos, habitualmente considera-se que este volume segue uma distribuição retangular uniforme, como apresenta a equação (12) [52-55].

$$u_{Vol}^{Cal} = \frac{\text{tolerância do material}}{\sqrt{3}} \quad (12)$$

A incerteza associada à repetibilidade ( $u_{Bal}^{Rep}$ ) de manipulação do material volumétrico é estimada pelo desvio padrão de medições de volume sucessivas calculado no ponto, que é equivalente ao desvio padrão das massas de água medidas com o material volumétrico ( $\sigma_{repetibilidade}$ ), visto que a densidade da água à temperatura ambiente é aproximadamente igual a 1 [52-55].

A incerteza associada ao efeito da temperatura reflete o impacto da variação da temperatura do laboratório na medição. Esta temperatura pode variar com uma distribuição normal  $u_{Vol}^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times E}{1,96}$  ou uma distribuição retangular  $u_{Vol}^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times E}{\sqrt{3}}$ , onde V corresponde ao volume do material,  $\Delta T$  a variação da temperatura e E o coeficiente de expansão da água. A distribuição utilizada para calcular a incerteza associada ao efeito da temperatura foi a retangular [55-57].

Na prática, quando são utilizadas soluções aquosas diluídas, poderá ser utilizado o coeficiente de expansão volúmica da água  $2,7 \times 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  [55]. Habitualmente, quando a temperatura varia num intervalo de  $\pm 4^\circ\text{C}$  em relação à temperatura de referência ou quando se efetua uma diluição através de duas medições de volumes sucessivas considera-se que esta componente de incerteza é desprezável ou se anula na diluição respetivamente [56]. Quando é considerado o efeito da temperatura, isto é, quando a temperatura do laboratório sofre variações superiores a  $4^\circ\text{C}$  em relação ao valor de referência, a incerteza padrão,  $u_V$ , associada ao volume, V, medido com o material volumétrico é calculada através da equação (13) [52-55]:

$$u_V = \sqrt{(\mu_V^{Calib})^2 + (\mu_V^{Rep})^2 + (\mu_V^{Temp})^2} \quad (13)$$

Na **Tabela 3.11** está representada a incerteza associada aos volumes medidos com uma micropipeta e uma seringa, no procedimento experimental. O **Anexo 4** apresenta os cálculos que conduziram aos valores de incerteza apresentados na tabela.

**Tabela 3.11** – Componentes de incerteza e incerteza combinada das medições de volume realizada no procedimento experimental.

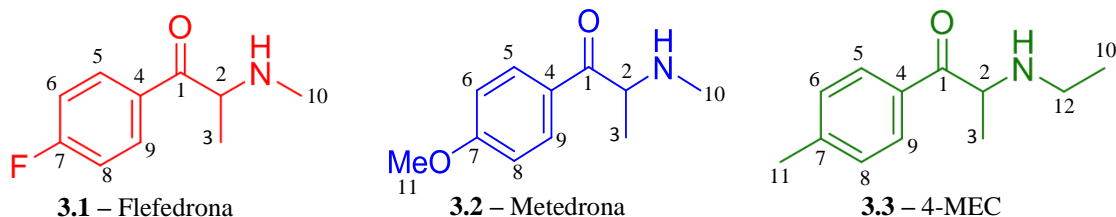
Volumes	Equipamento	$u_V^{Calib}$	$u_V^{Rep}$	$u_V^{Temp}$	$\mu_V$
$V_1 = 10\text{mL}$	Micropipeta	$3,46 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^{-5}$	$4,22 \times 10^{-7}$	$4,58 \times 10^{-5}$
$V_2 = 500 \mu\text{L}$	Seringa	$2,97 \times 10^{-6}$	$3,52 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-8}$	$4,60 \times 10^{-6}$

### 3.3.4. Incerteza associada à pureza do ácido maleico

A incerteza associada à pureza do ácido maleico foi retirada do rótulo comercial do produto, que corresponde a uma incerteza de  $4,5 \times 10^{-4}$ .

### 3.3.5. Incerteza da razão dos sinais de RMN $^1\text{H}$

A incerteza da razão dos sinais do analito e padrão interno, dos espectros de qRMN  $^1\text{H}$ , é estimada pelo desvio padrão das dez razões obtidas para cada catinona (**3.1**, **3.2** e **3.3**) considerando os desvios químicos e concentração da amostra em causa (**Tabela 3.12**, **3.13** e **3.14**). No **Anexo 3** apresentam-se os valores das áreas e respetivas razões obtidas para cada sinal de cada catinona nos 90 espectros analisados das amostras de Blast01, Bliss02 e Blow04. O **Anexo 3** também apresenta os desvios padrão das razões dos sinais.



**Tabela 3.12** – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (**3.1**, **3.2** e **3.3**) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

		$I_{H3}/I_{PI}$	$I_{H10}/I_{PI}$	$I_{H11}/I_{PI}$	$I_{H2}/I_{PI}$	$I_{H6/H8}/I_{PI}$	$I_{H5/H9}/I_{PI}$
<b>BLAST01</b> <b>(Flefedrona)</b>	Média	1,4752	1,4749	-	0,4873	0,9808	0,9812
	Desvio Padrão	3,51E-04	4,39E-04	-	4,54E-03	2,17E-04	3,05E-03
<b>BLISS02</b> <b>(Metedrona)</b>	Média	1,4347	1,4349	1,4253	0,4747	0,9507	0,9521
	Desvio Padrão	8,54E-04	6,60E-04	7,25E-04	1,47E-03	3,33E-04	2,72E-04
<b>BLOW04</b> <b>(4-MEC)</b>	Média	1,5069	1,5054	1,5055	0,5093	-	-
	Desvio Padrão	4,29E-04	3,70E-03	3,98E-04	1,89E-03	-	-

**Tabela 3.13** – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (**3.1**, **3.2** e **3.3**) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

		$I_{H3}/I_{PI}$	$I_{H10}/I_{PI}$	$I_{H11}/I_{PI}$	$I_{H2}/I_{PI}$	$I_{H6/H8}/I_{PI}$	$I_{H5/H9}/I_{PI}$
<b>BLAST01</b> (Flefedrona)	<b>Média</b>	1,4573	1,4413	-	0,4886	0,9678	0,9670
	<b>Desvio</b>	1,26E-02	7,60E-03	-	1,39E-02	1,01E-03	1,99E-03
	<b>Padrão</b>						
<b>BLISS02</b> (Metedrona)	<b>Média</b>	1,4372	1,4171	1,4144	0,4844	0,9487	0,9500
	<b>Desvio</b>	1,03E-02	6,25E-03	6,38E-03	9,35E-03	8,57E-04	9,82E-04
	<b>Padrão</b>						
<b>BLOW04</b> (4-MEC)	<b>Média</b>	1,5069	1,5026	1,5039	0,5172	-	-
	<b>Desvio</b>	8,42E-03	1,07E-02	7,63E-03	7,91E-03	-	-
	<b>Padrão</b>						

**Tabela 3.14** – Média e desvio padrão das razões das áreas dos sinais de ressonância das catinonas (**3.1**, **3.2** e **3.3**) nas 10 réplicas das soluções amostra de concentração em Blast01, Bliss02 e Blow04 de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

		$I_{H3}/I_{PI}$	$I_{H10}/I_{PI}$	$I_{H11}/I_{PI}$	$I_{H2}/I_{PI}$	$I_{H6/H8}/I_{PI}$	$I_{H5/H9}/I_{PI}$
<b>BLAST01</b> (Flefedrona)	<b>Média</b>	1,4287	1,4200	-	0,5398	0,9645	0,9657
	<b>Desvio</b>	2,48E-02	1,67E-02	-	4,41E-02	3,80E-03	2,80E-03
	<b>Padrão</b>						
<b>BLISS02</b> (Metedrona)	<b>Média</b>	1,4274	1,4082	1,4076	0,4895	0,9493	0,9503
	<b>Desvio</b>	1,94E-02	1,02E-02	1,49E-02	2,16E-02	1,35E-03	2,86E-03
	<b>Padrão</b>						
<b>BLOW04</b> (4-MEC)	<b>Média</b>	1,5122	1,5101	1,5082	0,5314	-	-
	<b>Desvio</b>	2,80E-02	2,91E-02	2,31E-02	3,21E-02	-	-
	<b>Padrão</b>						

### 3.3.6. Incerteza associada aos fatores de diluição

Na **Tabela 3.15** encontram-se os valores obtidos para a incerteza associada aos fatores de diluição envolvidos na obtenção de soluções dos produtos Blas01, Bliss02 e Blow04 com concentrações de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e 4 mg.mL<sup>-1</sup> a partir da solução original com 20 mg.mL<sup>-1</sup>. No **Anexo 4** os cálculos envolvidos.

**Tabela 3.15** – Incerteza padrão,  $u_{Fd}$ , e incerteza padrão relativa,  $u'_{Fd}$ , dos fatores de diluição da solução de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Fator de diluição	Fd	$u_{Fd}$	$u'_{Fd}$
1:5	1+4 = 5	0,37858	0,07572
1:10	1+9 = 10	0,31830	0,03183

### 3.3.7. Incerteza Combinada

Para o cálculo da incerteza combinada usou-se o método numérico de Kragten<sup>[60]</sup>, um método simples e rápido que é utilizado para o cálculo da incerteza padrão combinada reproduzindo numericamente a lei de propagação de incertezas **(14)** <sup>[60]</sup>.

$$s_y^2 = \left(\frac{\delta y}{\delta x_1}\right)^2 s_{x_1}^2 + \left(\frac{\delta y}{\delta x_2}\right)^2 s_{x_2}^2 + \left(\frac{\delta y}{\delta x_3}\right)^2 s_{x_3}^2 + \left(\frac{\delta y}{\delta x_4}\right)^2 s_{x_4}^2 \quad \mathbf{(14)}$$

A Tabela 3.16 descreve a implementação do método de Kragten numa folha de cálculo, onde  $x_1, x_2, x_3, x_4$  são os valores medidos das quantidade de entrada,  $u_{x1}, u_{x2}, u_{x3}$  e  $u_{x4}$  são as respectivas incertezas padrão e  $u_y$  é a incerteza padrão combinada calculada pela equação **(15)** <sup>[60]</sup>. O cálculo dos valores  $\Delta y_i$  é apresentado na Tabela 3.16.

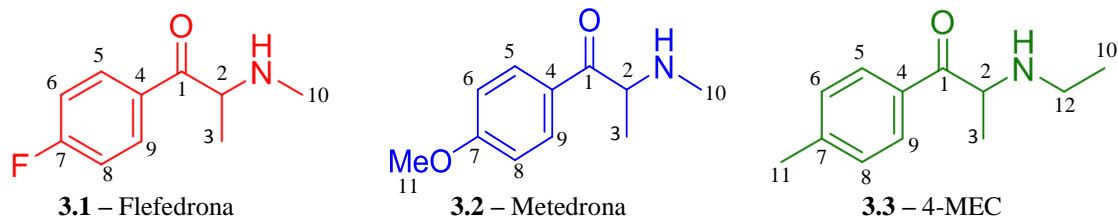
$$u_y \sqrt{[(\Delta y_1)^2 + (\Delta y_2)^2 + (\Delta y_3)^2 + (\Delta y_4)^2]} \quad \mathbf{(15)}$$

Neste método, os desvios-padrão são calculados numericamente sem violar a condição da independência mútua e com um ganho substancial de tempo <sup>[60]</sup>.

**Tabela 3.16** – Exemplo da implementação do método de Kragten, para a combinação de componentes de incerteza, numa folha de cálculo.

	A	B	C	D	E
1		$u_{x1}$	$u_{x2}$	$u_{x3}$	$u_{x4}$
2					
3	$x_1$	$X_1=x_1+u_{x1}$	$x_1$	$x_1$	$x_1$
4	$x_2$	$x_2$	$X_2=x_2+u_{x2}$	$x_2$	$x_2$
5	$x_3$	$x_3$	$x_3$	$X_3=x_3+u_{x3}$	$x_3$
6	$x_4$	$x_4$	$x_4$	$x_4$	$X_4=x_4+u_{x4}$
7					
8	$y=f(x_1,x_2,...)$	$y_1=f(X_1,x_2,...)$	$y_2=f(x_1,X_2,...)$	$y_3=f(...,X_3,x_4)$	$y_4=f(...,x_3,X_4)$
9		$\Delta y_1= y_1-y $	$\Delta y_2= y_2-y $	$\Delta y_3= y_3-y $	$\Delta y_4= y_4-y $
10	$(u_y)^2$	$(\Delta y_1)^2$	$(\Delta y_2)^2$	$(\Delta y_3)^2$	$(\Delta y_4)^2$
11	$u_y$				

As Tabelas seguintes apresentam os valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) em percentagem, para as amostras de Blast01, Bliss02 e Blow04, estimados pelos diferentes sinais da fletedrona (**3.1**), metedrona (**3.2**) e 4-MEC (**3.3**), e a respetiva incerteza padrão combinada calculada pelo método de Kragten.



**Tabela 3.17** – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a fletedrona, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da fletedrona nas soluções amostra de diferentes concentrações em Blast01.

Posição	H3		H10		H2		H6/H8		H5/H9	
Blast01 (mg.mL <sup>-1</sup> )	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)
2	87,54	3,55	87,00	3,35	99,21	8,88	88,64	3,26	88,76	3,26
4	89,29	6,99	88,31	6,89	89,80	7,45	88,94	6,92	88,87	6,92
20	90,38	1,63	90,37	1,63	89,57	1,82	90,14	1,63	90,18	1,65

**Tabela 3.18** – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a metedrona, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da metedrona nas soluções amostra de diferentes concentrações em Bliss02.

Posição	H3		H10		H11		H2		H6/H8		H5/H9	
Bliss02 (mg.mL <sup>-1</sup> )	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)
2	96,78	3,81	95,47	3,59	95,43	3,66	99,57	5,72	96,54	3,57	96,64	3,58
4	97,43	7,63	96,07	7,50	95,89	7,49	98,52	7,92	96,48	7,5	96,61	7,53
20	97,27	1,82	97,28	1,82	96,63	1,80	96,56	1,83	96,68	1,81	96,82	1,81

**Tabela 3.19** – Valores da fração mássica ( $W_{CAT}$ ) estimados para a 4-MEC, e respetiva incerteza padrão combinada, a partir dos diversos sinais de ressonância da 4-MEC nas soluções amostra de diferentes concentrações em Blow04.

Posição	H3		H10		H11		H2	
Blow04 (mg.mL <sup>-1</sup> )	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)	$W_{CAT}$ (%)	$u$ (%)
2	91,74	3,74	91,61	3,76	91,50	3,61	96,71	6,82
4	91,41	7,12	91,15	7,11	91,23	7,10	94,13	7,45
20	91,41	1,60	91,32	1,61	9,33	1,59	92,67	1,65

O pressuposto de linearidade de variação do resultado final em função da incerteza das quantidades de entrada, do método de Kragten é válido. Este pressuposto foi comprovado pela equivalência das incertezas padrão combinadas estimadas quando se consideram incrementos positivos ou negativos das variáveis de entrada com a dimensão da respetiva incerteza padrão.

A avaliação da incerteza realizada permitiu concluir que a fonte de incerteza maioritária é a da medição das massas dos produtos das *smartshops*. Por outro lado, a incerteza das massas molares, tanto das catinonas como do ácido maleico, e a incerteza associada às razões dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  são as incertezas minoritárias.

### 3.3.8. Incerteza Expandida

A incerteza expandida fornece um intervalo de confiança que abrange uma grande fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. É calculada pela multiplicação da incerteza padrão combinada pelo fator de expansão escolhido a fim de obter uma incerteza para um nível de confiança mais elevado [53,54,57].

$$U = k u_c$$

$U$  - Incerteza expandida;  $u_c$  - Incerteza padrão combinada;  $k$  - Factor de expansão ( $k=2$  para 95% de confiança,  $k=3$  para 99% de confiança)

No cálculo da incerteza expandida foi definido um intervalo de confiança de 95%, logo o fator de expansão usado foi  $k=2$ . As Tabelas 3.20, 3.21 e 3.22 apresentam os valores da fração mássica ( $W_{\text{CAT}}$ ) de catinona nas amostras Blast01, Bliss02 e Blow04, com a respetiva incerteza expandida, considerando determinado sinal de analito e concentração da solução amostra.

$$U = 2 \times u_c$$

**Tabela 3.20** – Valores estimados de fração mássica ( $W_{\text{CAT}}$ ) de flefedrona na amostra Blast01, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Blast01.

Posição C (mg.mL <sup>-1</sup> )	H3		H10		H2		H6/H8		H5/H9	
	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)
2	87,5	7,1	87,0	6,7	99,2	17,8	88,6	6,5	88,8	6,5
4	89,3	14,0	88,3	13,8	89,8	14,9	88,9	13,8	88,9	13,8
20	90,4	3,3	90,4	3,3	89,6	3,6	90,1	3,3	90,2	3,3



**Tabela 3.21** – Valores estimados de fração mássica ( $W_{\text{CAT}}$ ) de metedrona na amostra Bliss02, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Bliss02.

Posição	H3		H10		H11		H2		H6/H8		H5/H9	
C (mg.mL <sup>-1</sup> )	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)
2	96,8	7,6	95,5	7,2	95,4	7,3	99,6	11,4	96,5	7,1	96,6	7,2
4	97,4	15,3	96,1	15,0	95,9	15,0	98,5	15,8	96,5	15,0	96,6	15,1
20	97,3	3,6	97,3	3,6	96,6	3,6	96,6	3,7	96,7	3,6	96,8	3,6

**Tabela 3.22** – Valores estimados de fração mássica ( $W_{\text{CAT}}$ ) de 4-MEC na amostra Blow04, e respetiva incerteza expandida para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, determinados com base em diferentes sinais de ressonância do analito, usando soluções amostra com diferentes concentrações de Blow04.

Posição	H3		H10		H11		H2	
C (mg.mL <sup>-1</sup> )	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)	$W_{\text{CAT}}$ (%)	U (%)
2	91,7	7,5	91,6	7,5	91,5	7,2	96,7	13,6
4	91,4	14,2	91,2	14,2	91,2	14,2	94,1	14,9
20	91,4	3,2	91,3	3,2	91,3	3,2	92,7	3,3

O melhor sinal de ressonância para quantificar a fletedrona no Blast01 é o protão ligado ao carbono 10, para a metedrona no produto Bliss02 é o protão ligado ao carbono 10 e para a 4-MEC no Blow04 é o protão ligado ao carbono 11. Foram escolhidos estes sinais porque são os que apresentam menor incerteza.

### 3.4. Aplicação da metodologia validada

Na primeira parte do trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia para a quantificação das catinonas: fletedrona, metedrona e 4-MEC em produtos de *smartshops*, recorrendo à avaliação do desempenho do método quando aplicado à análise de 3 produtos (Blast01, Bliss02 e Blow04). Nesta fase do estudo, foram realizadas medições replicadas das diversas amostras para se reunir informação adequada sobre a qualidade da medição.

Na segunda parte do trabalho, aplicou-se a metodologia desenvolvida à quantificação das mesmas catinonas nos produtos Blast22, Bliss25, Bliss26, Blow29, Blow30, Bloom03, Bloom27 e Bloom28. As amostras foram quantificadas com base em sinais únicos de RMN (i.e. não foram repetidas as medições replicadas realizada durante a validação).

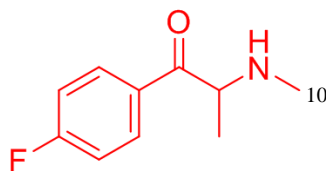
Antes da aplicação do procedimento de medição às novas amostras desenvolveram-se modelos do desempenho da medição em função da concentração de analito na solução amostra. Este estudo pode mesmo ser considerado como parte do desenvolvimento do método de quantificação.

A quantificação da catinona nas amostras Blast01, Blast22, Bliss02, Bliss25, Bliss26, Blow04, Blow29, Blow30, Bloom03, Bloom27 e Bloom28, iniciou-se com a seleção do sinal de ressonância dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ .

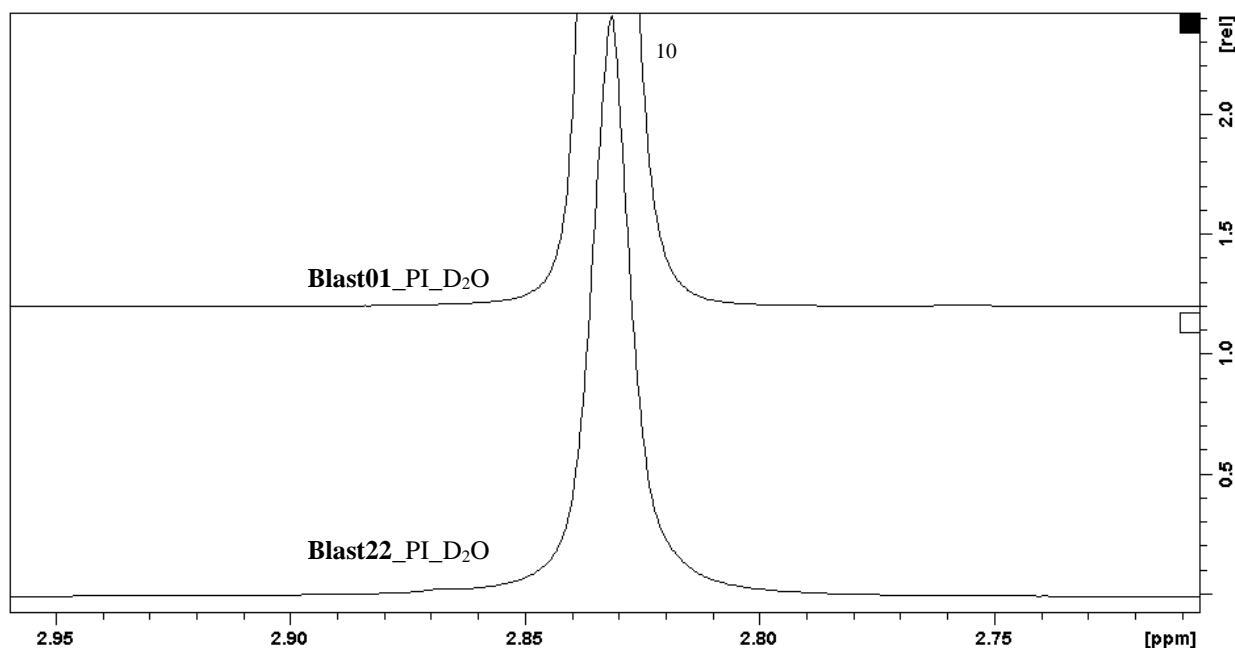
Recorrendo aos sinais recolhidos durante a validação do procedimento de medição, em particular as características dos sinais instrumentais em função da concentração de analito na solução amostra, construíram-se modelos de variação da precisão da razão dos sinais de analito e padrão interno em função da concentração de analito na solução quantificada. As figuras seguintes apresentam os dados experimentais recolhidos e os modelos de variação de precisão da razão dos sinais em função da concentração de analito na solução amostra. Estes modelos têm como objetivo estimar a componente da incerteza associada à precisão dos sinais de RMN a quando da análise de amostras desconhecidas para as quais apenas é obtido uma leitura instrumental (i.e. para as quais não será estimada diretamente a precisão. As páginas seguintes apresentam estes modelos para as três catinonas quantificadas.

### Flefedrona:

Para a quantificação de flefedrona no produto Blast22, foi utilizado o sinal correspondente ao próton relacionado com o carbono 10, porque é o que apresenta menor incerteza para o produto Blast01 e no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Blast22 não apresenta nenhuma sobreposição (**Figura 3.11**). A incerteza associada aos sinais de RMN foi estimada considerando a precisão dos mesmos em função da concentração de analito na solução amostra, estimada pela análise de soluções da amostra Blast01 com diversas concentrações de amostra. A **Tabela 3.23** apresenta os dados considerados e a **Figura 3.12** o modelo de variação do desvio padrão relativo da repetibilidade do sinal instrumental com a concentração de analito na solução amostra.



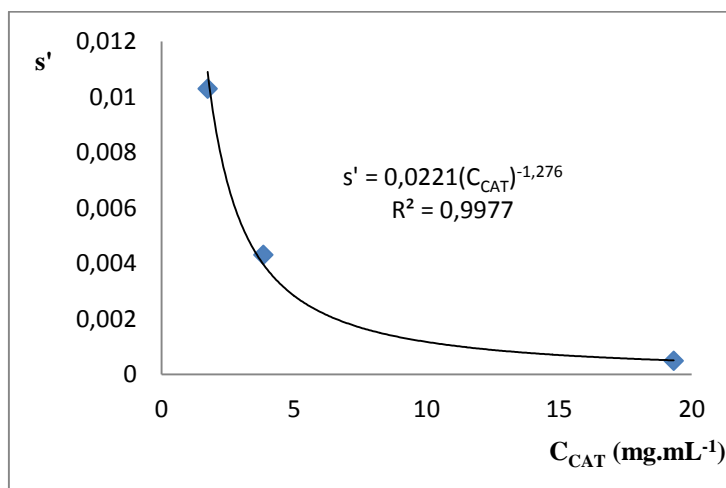
3.1 – Flefedrona



**Figura 3.11** – Espectros RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 10 da solução de  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  das amostras Blast01 e Blast22.

**Tabela 3.23** – Valores de concentração de flefedrona na solução amostra,  $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do protão relacionado com o carbono 10 da flefedrona e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Blast01. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A.

A (mg.mL <sup>-1</sup> )	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s'$
2	1,74	0,01030
4	3,84	0,00432
20	19,32	0,00049



**Figura 3.12** – Gráfico de variação do desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de flefedrona na solução amostra.

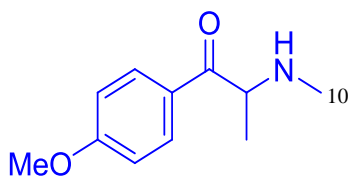
A tabela 3.24 apresenta como se estimou  $s'$  para a análise da amostra Blast22 e o teor final reportado com incerteza expandida.

**Tabela 3.24** – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de flefedrona na amostra Blast22. Teor de flefedrona na solução amostra,  $C_{CAT}$ ,  $s'$  estimado pelo modelo descrito na figura 3.11 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2.

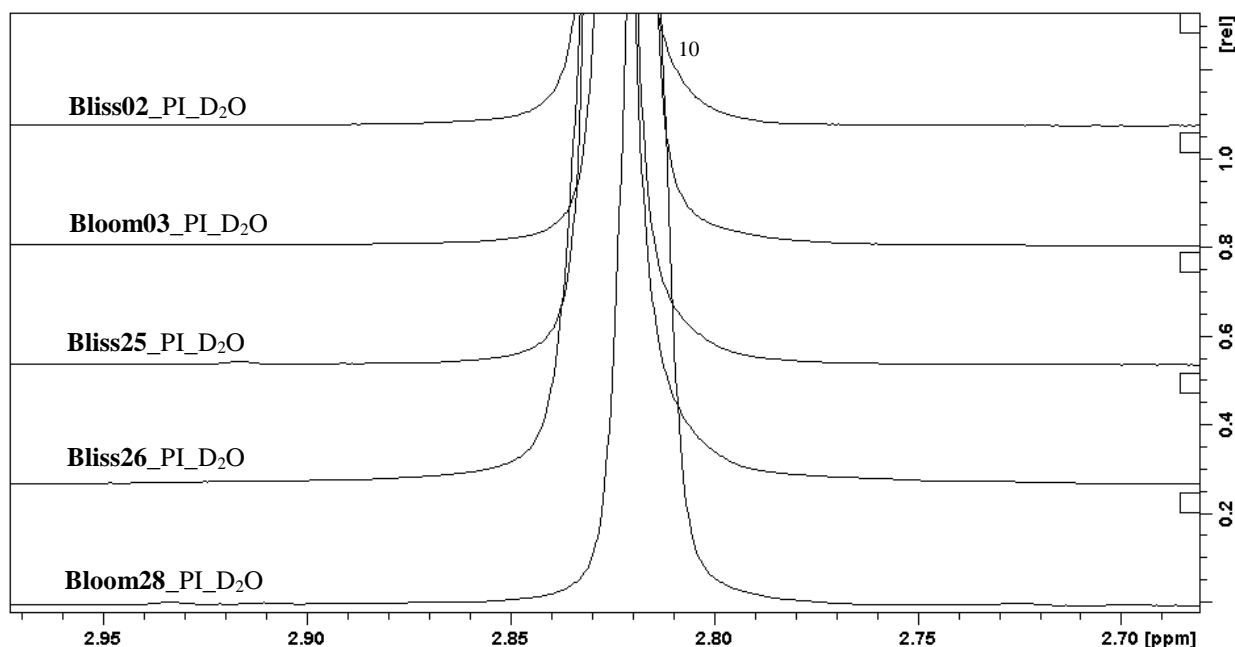
Amostra	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s'$	$u(W_{CAT})$	$W_{CAT} \pm U(W_{CAT})$
Blast22	17,6	0,00058	0,0145	$0,80 \pm 0,029$

### Metedrona:

Para a quantificação de metedrona nos produtos Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28, foi utilizado o sinal correspondente ao próton relacionado com o carbono 10, porque é o que apresenta menor incerteza no produto Bliss02 e no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28 não apresenta nenhuma sobreposição (**Figura 3.13**). A incerteza associada aos sinais de RMN foi estimada considerando a precisão dos mesmos em função da concentração de analito na solução amostra, estimada pela análise de soluções da amostra Bliss02 com diversas concentrações de amostra. A **Tabela 3.25** apresenta os dados considerados e a **Figura 3.14** o modelo de variação do desvio padrão relativo da repetibilidade do sinal instrumental com a concentração de analito na solução amostra.



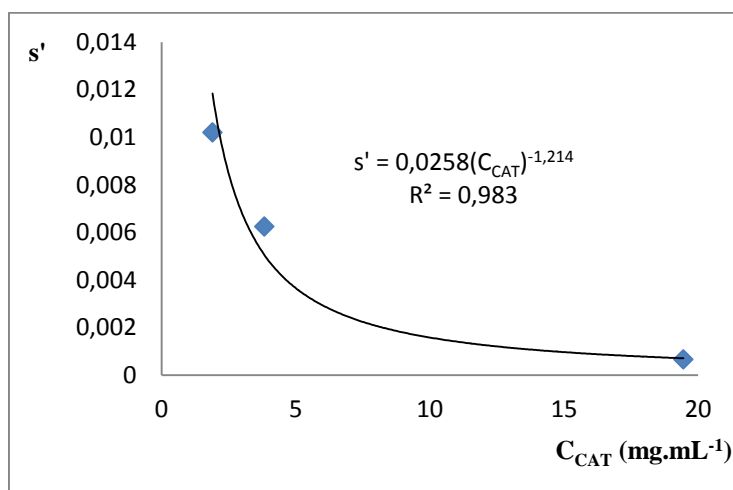
3.2 – Metedrona



**Figura 3.13** – Espectros RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 10 da solução de  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  das amostras Bliss02, Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28.

**Tabela 3.25** – Valores de concentração de metedrona na solução amostra,  $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do protão relacionado com o carbono 10 da metedrona e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Bliss02. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A.

A (mg.mL <sup>-1</sup> )	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s'$
2	1,09	0,01020
4	3,84	0,00625
20	19,45	0,00066



**Figura 3.14** – Gráfico de variação do desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de metedrona na solução amostra.

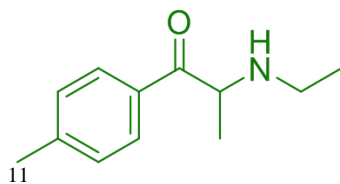
A tabela 3.26 apresenta como se estimou  $s'$  para a análise das amostras Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28 e o teor final reportado com incerteza expandida.

**Tabela 3.26** – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de metedrona nas amostras Bloom03, Bliss25, Bliss26 e Bloom28. Teor de metedrona na solução amostra,  $C_{CAT}$ ,  $s'$  estimado pelo modelo descrito na figura 3.12 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2.

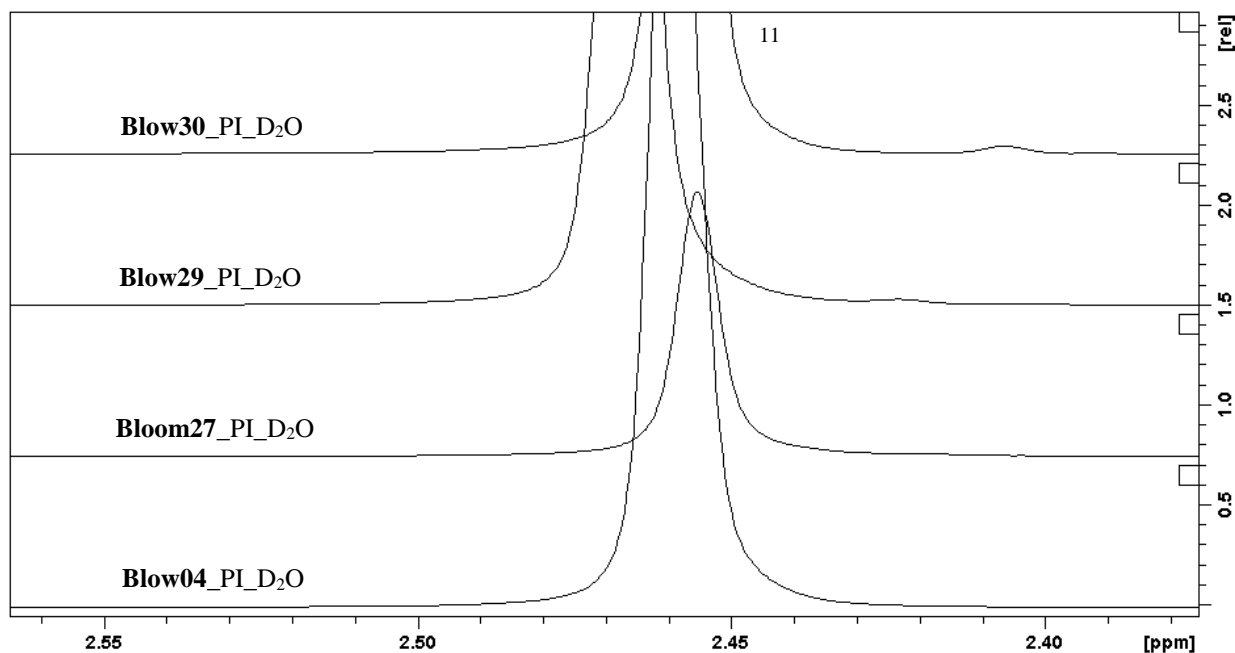
Amostra	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s'$	$u(W_{CAT})$	$W_{CAT} \pm U(W_{CAT})$
Bloom03	13,7	0,00105	0,0108	0,6120 $\pm$ 0,0216
Bliss25	21,0	0,00063	0,0173	0,9509 $\pm$ 0,0346
Bliss26	20,6	0,00064	0,0176	0,9409 $\pm$ 0,0352
Bloom28	12,6	0,00117	0,0105	0,5748 $\pm$ 0,0210

#### 4-MEC:

Para a quantificação de 4-MEC nos produtos Bloom27, Blow29 e Blow30, foi utilizado o sinal correspondente ao próton relacionado com o carbono 11, porque é o que apresenta menor incerteza para o produto Blow04 e no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Bloom27, Blow29 e Blow30 não apresenta nenhuma sobreposição (**Figura 3.15**). A incerteza associada aos sinais de RMN foi estimada considerando a precisão dos mesmos em função da concentração de analito na solução amostra, estimada pela análise de soluções da amostra Blow04 com diversas concentrações de amostra. A **Tabela 3.27** apresenta os dados considerados e a **Figura 3.16** o modelo de variação do desvio padrão relativo da repetibilidade do sinal instrumental com a concentração de analito na solução amostra.



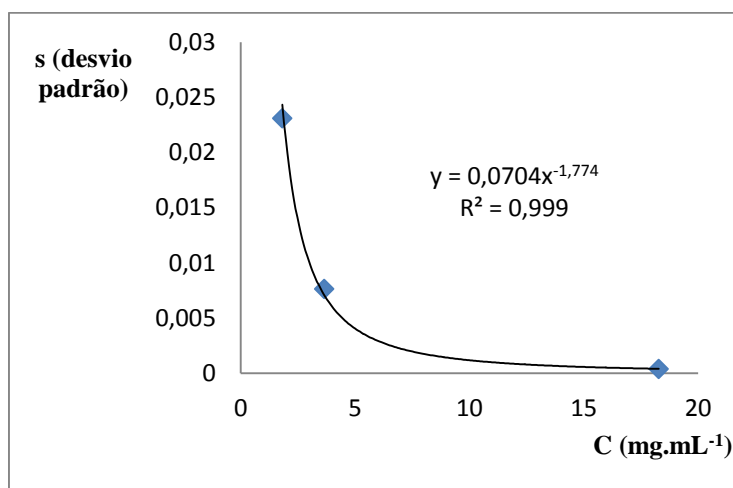
3.3 – 4-MEC



**Figura 3.15** – Espectros RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz ampliado, da zona do sinal correspondente ao próton ligado ao carbono 11 da solução de  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  das amostras Blow04, Bloom27, Blow29 e Blow30.

**Tabela 3.27** – Valores de concentração de 4-MEC na solução amostra,  $C_{CAT}$ , e correspondentes desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade da razão do sinal do próton relacionado com o carbono 11 da 4-MEC e com o sinal do padrão interno. Os dados apresentados referem-se a sinais recolhidos da análise da amostra Blow04. A primeira coluna indica a concentração de amostra da solução amostra, A.

Soluções (mg.mL <sup>-1</sup> )	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s$ (desvio padrão da razão das integrações)
2	1,82	0,0231
4	3,65	0,00763
20	18,27	0,0004



**Figura 3.16** – Gráfico de variação do desvio padrão relativo,  $s'$ , da repetibilidade dos sinais de RMN em função da concentração de 4-MEC na solução amostra.

A **Tabela 3.28** apresenta como se estimou  $s'$  para a análise das amostras Bloom27, Blow29 e Blow30 e o teor final reportado com incerteza expandida.

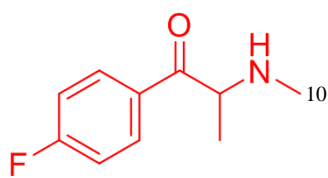
**Tabela 3.28** – Cálculos intermédios relevantes e finais da quantificação de 4-MEC nas amostras Bloom27, Blow29 e Blow30. Teor de 4-MEC na solução amostra,  $C_{CAT}$ ,  $s'$  estimado pelo modelo descrito na figura 3.13 e fração mássica da catinona com incerteza expandida ( $U(W_{CAT})$ ) para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Foi considerado um fator de cobertura igual a 2.

	$C_{CAT}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$s'$	$u(W_{CAT})$	$W_{CAT} \pm U(W_{CAT})$
<b>Bloom27</b>	6,4	0,00262	0,0057	0,2914±0,0114
<b>Blow29</b>	20,4	0,00034	0,0162	0,9266±0,0324
<b>Blow30</b>	19,4	0,00037	0,0159	0,8796±0,0318

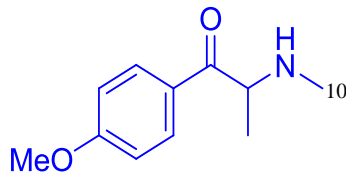
A **Tabela 3.29** reúne os valores da fração mássica das diversas catinonas nas várias amostras, expressos em percentagem e com a respetiva incerteza expandida, considerando os sinais de RMN que garantem menores incertezas. A incerteza expandida foi estimada para um nível de confiança de aproximadamente 95%, utilizando um fator de expansão 2. Os resultados reportados apresentam uma incerteza expandida relativa que varia de 2,9% a 3,8%. Tendo em conta que esta incerteza expandida relativa é inferior ao



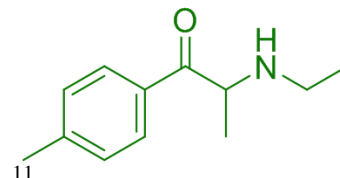
valor alvo definido de 5,6% considera-se que o procedimento de medição é adequado ao objetivo. Os métodos de análise desenvolvidos conseguem destingir diferenças de teor de amostras superiores a 10%.



3.1 – Flefedrona



3.2 – Metedrona



3.3 – 4-MEC

**Tabela 3.29** – Fração mássica das diversas catinonas nas amostras analisadas, expressos em percentagem e com incerteza expandida, considerando os sinais de RMN que garantem menores incertezas. A incerteza expandida foi estimada para um nível de confiança de aproximadamente 95% utilizando um fator de expansão de 2.

Amostras	Catinona	Sinal utilizado na quantificação	W <sub>CAT</sub> ± U (%)
Blast01	Flefedrona	H10	90,4±3,3
Blast22	Flefedrona	H10	80,2±2,9
Bliss02	Metedrona	H10	97,3±3,6
Bliss25	Metedrona	H10	95,1±3,5
Bliss26	Metedrona	H10	94,1±3,5
Bloom03	Metedrona	H10	61,2±1,8
Bloom28	Metedrona	H10	57,2±2,1
Blow04	4-MEC	H11	91,3±3,2
Blow29	4-MEC	H11	92,7±3,2
Blow30	4-MEC	H11	88,0±3,2
Bloom27	4-MEC	H11	29,1±1,1

## 4.CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido para a quantificação de flefedrona, metedrona e 4-metil-N-etilcatinona (4-MEC) em drogas sintéticas comercializadas em *smartshops*, é seletivo devido aos sinais de RMN selecionados, é de aplicação fácil e expedita, e apresenta uma incerteza suficientemente baixa para distinguir diferenças superiores a 10% da composição de diversos produtos.

O método numérico de Kragten foi aplicado com sucesso à combinação das componentes de incerteza visto que o resultado final varia aproximadamente linearmente considerando incrementos positivos ou negativos das variáveis de entrada dentro de um intervalo definido pela sua incerteza padrão.

A fonte de incerteza maioritária destas determinações é a incerteza associada à toma de amostra. Desta forma, caso seja necessário reduzir a incerteza da medição deverá ser aumentada a toma de amostra ou utilizada uma microbalança. Tendo em conta que as restantes componentes de incerteza são desprezáveis, pode-se reduzir o custo da análise através da utilização de material volumétrico menos dispendioso, com desempenho mais incerto, mas que mantenha uma contribuição irrelevante para a incerteza combinada.

Com base na análise da quantificação de ressonância magnética nuclear de próton, qRMN  $^1\text{H}$ , e no método de Kragten verificou-se que a percentagem das três principais catinonas estudadas nos produtos comercializados nas "*smartshops*" são: **Flefedrona** [Blast01 (90,4 $\pm$ 3,3) %, Blast22 (80,2 $\pm$ 2,9)], **Metedrona** [Bliss02 (97,3 $\pm$ 3,6) %, Bloom03 (61,2 $\pm$ 2,2) %, Bliss25 (95,1 $\pm$ 3,5) %, Bliss26 (94,1 $\pm$ 3,5) %, Bloom28 (57,5 $\pm$ 2,1) %], **4-MEC** [Blow04 (91,3 $\pm$ 3,2) %, Bloom27 (29,1 $\pm$ 1,1) %, Blow29 (92,7 $\pm$ 3,2) %, Blow30 (88,0 $\pm$ 3,2) %] (relatados com incerteza expandida e estimativa para um nível de confiança de 95% aproximadamente, utilizando um fator de expansão 2).

No que respeita às amostras analisadas conclui-se que as amostras de Blast apresentam uma percentagem de flefedrona acima de 80%, as amostras de Bliss uma percentagem de metedrona acima de 90% e as amostras de Blow uma percentagem de 4-MEC acima de 85%. As amostras de Bloom são as que diferem mais na composição das catinonas apresentando uma percentagem entre 57% e 62% para os produtos que contêm metedrona e uma percentagem acima de 29% para o produto que contém 4-MEC.

## 5.BIBLIOGRAFIA

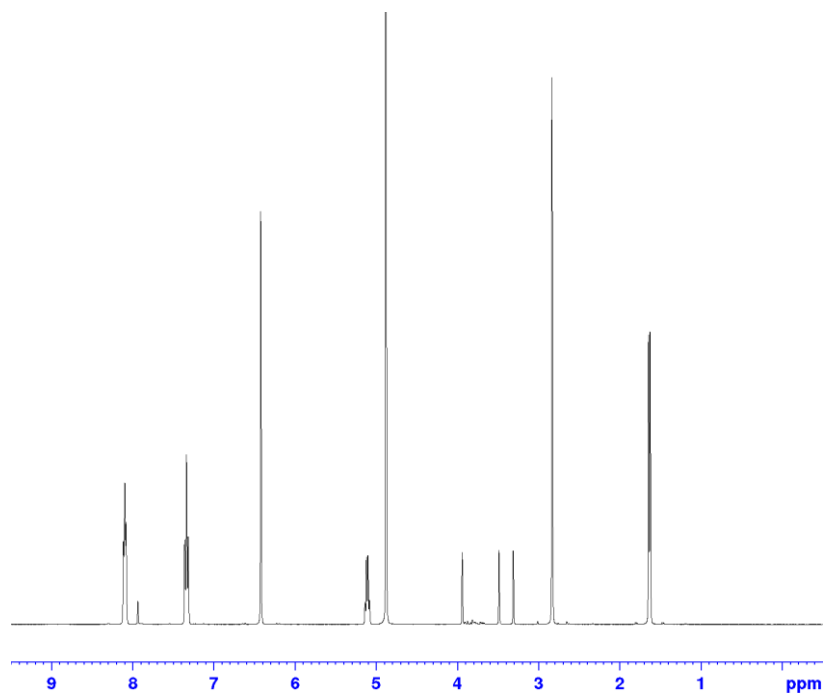
- [1] – [http://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/who\\_lexicon/en/](http://www.who.int/substance_abuse/terminology/who_lexicon/en/) (acedido em Setembro de 2014)
- [2] – <http://www.emcdda.europa.eu/index.cfm> (acedido em Agosto de 2014)
- [3] – Arunotayanun W., Gibbons S.; “Natural product «legal highs»”; Nat. Prod. Rep. 29(11):1304-1316; 2012.
- [4] – Prosser J.M., Nelson L.S.; “The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones”; J. Med. Toxicol 8(1):33-42; 2012.
- [5] – Baumann M.H., Partilla J.S., Lehner K.R.; “Psychoactive «bath salts»: not so soothing”; Eur. J. Pharmacol 698(1-3):1-5; 2013.
- [6] – **Decreto-Lei nº54/2013**. Diário da República 75; 2013
- [7] – Corazza O., Demetrovics Z., van den Brink W., Schifano, F.; “Legal highs” an inappropriate term for “novel psychoactive drugs” in drug prevention and scientific debate; Int. J. Drug Policy 24; 2013.
- [8] – <http://emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cathinones> (acedido em Agosto de 2014)
- [9] – Adebamiro A., Perazella M. A.; “Recurrent acute kidney injury following bath salts intoxication”; Am. J. Kidney Dis 59; 2012.
- [10] – Hillebrand J., Olszewski D., Sedefov R.; Legal highs on the Internet; Subst. Use Misuse 45; 2010.
- [11] – Schmidt M.M., Sharma A., Schifano F., Feinmann C.; “Legal highs” on the net- Evaluation of UK-based Websites, products and product information; Forensic Sci. Int. 206; 2010.
- [12] – Vardakou I., Pistos C., Spiliopoulou C.; Drugs for youth via Internet and the example of mephedrone; Toxicol. Lett. 201; 2011.
- [13] – Walsh C.; Drugs, the Internet and change; J. Psychoactive Drugs 43; 2011.
- [14] – McGraw M., McGraw L.; “Bath salts: not as harmless as they sound”; J. Emerg Nurs. 39; 2012.
- [15] – Zuba D., Byrska B.; “Prevalence and co-existence of active components of «legal highs»”; Drug Test. Anal.; 2012.
- [16] – European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; “The state of the drugs problem in Europe”; Annual Report; 2010.

- [17] – Ayres T.C., Bond J.W.; “A chemical analysis examining the pharmacology of novel psychoactive substances freely available over the Internet and their impact on public (ill)health. Legal highs or illegal highs?”; *BMJ Open* 2; 2012.
- [18] – Brandt S.D., Sumnall H.R., Measham F., Cole J.; “Analyses of second-generation «legal highs» in the UK: initial findings”; *Drug Test. Anal.* 2; 2010.
- [19] – Davies S., Wood D.M., Smith G., Button J., Ramsey J., Archer R., Holt D.W., Dargan P.I.; “Purchasing «legal highs» on the Internet-is there consistency in what you get?”; *QJM* 103; 2010.
- [20] – Hillebrand J., Olszewski D., Sedefov R.; “Legal highs on the Internet”; *Subst. Use Misuse* 45; 2010.
- [21] – Schmidt M.M., Sharma A., Schifano F., Feinmann C.; “«Legal highs» on the net- Evaluation of UK-based Websites, products and product information”; *Forensic Sci. Int.* 206; 2010.
- [22] – Zawilska J. B., Wojcieszak J.; Designer cathinones – “An emerging class of novel recreational drugs”; *Forensic Science International* 231; 2013.
- [23] – Gibbons S., Zloh M.; “An analysis of «legal high» mephedrone”; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20; 2010.
- [24] – Hassan N.A., Gunaid A.A., Murray-Lyon I.M.; “Khat (*Catha edulis*): health aspects of khat chewing”; *East Mediterr. Health J.* 13; 2007.
- [25] – Upenn African Studies; “Khat Information”; January 2010.
- [26] – Ballint, Erica E.; “Khat: a controversial plant”; *Wiener klinische Wochenschrift; The Middle European Journal of Medicine*; September 2009.
- [27] – Kelly J. P.; “Cathinone derivatives: A review of their chemistry, pharmacology and toxicology”; *Drug Testing and Analysis*; 2011.
- [28] – Saem de Burnaga Sanchez J.; “Suru n homologue de l’ephedrine”; *Buletin de la Société Chimique de France*; 1929.
- [29] – Jacob P., Shulgin A. T.; Patent WO9639133 1996, 19. CA 126: 117961; Neurobiological Technologies Inc; USA.
- [30] – Meltzer P., Butler D., Deschamps J. R., Madras B. K.; “(4-methylphenyl)-2-pyrrolidin-1-yl-pentan-1-one (Pyrovalerone) analogues: a promising class of monoamine uptake inhibitors”; *Journal of Medicinal Chemistry*; 2006.
- [31] – <https://www.unodc.org/> (acedido em Setembro de 2014).
- [32] – World Health Organization; Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting; “4-Fluoromethcathinone (fledrona, 4-MEC): Critical Review Report”; 2014.

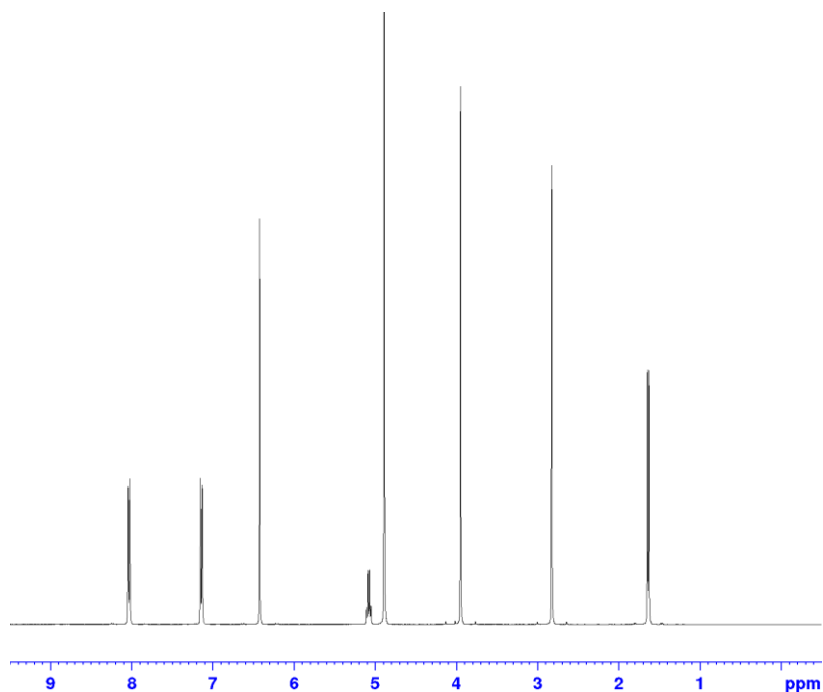
- [33] – Thornton S.L., Gerona R.R., Tomaszewski C.A.; “ Psychosis from a bath salt product containing flephedrone and MDVP with serum, urine, and product quantification; J. Med. Toxicol 8(3): 310-313; 2012
- [34] – Power M.; “Mephedrone: the future of drug dealing?”; Druglink magazine; 2009.
- [35] – <http://www.thelocal.se/20091014/22648> (acedido em Setembro de 2014)
- [36] – World Health Organization; Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting; “4-Methylethcathinone (4-MEC): Critical Review Report”; 2014.
- [37] – Gil D., Adamowicz P., Skulska A., Tokarczyk B., Stanaszek E.; “Analysis of 4-MEC in biological and non-biological material – three case reports.”; Forensic Sci. Int. 228(1-3):E11-E15.; 2013
- [38] – Rojek S., Klys M., Maciów M., Kula K., Strona M.; “Two fatal cases of intoxication with 4-MMC and 4-MEC – medicolegal expertise”; Presented at the Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists; Japan; 2012.
- [39] – Rojek S., Klys M., Maciów M., Kula K., Strona M.; “Cathinones derivatives related deaths exemplified by two cases involving methcathinone with 4-methylmethcathinone and 4-methylethcathinone”; Drug Test Anal.; 2014.
- [40] – Iversen L., “Consideration of the cathinones, Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD); 2010.
- [41] – Skoog, Holler, Nieman; “Principios de Análises Instrumental”; 5º; 1992.
- [42] – Hays P.A.; “Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) Methods for Determining the Purity of Reference Drug Standards and Illicit Forensic Drug Seizures”; J. Forensic Sci., 50(6); 2005.
- [43] – Jayawickrama D. A., Larive C. K.; “Anal. Chem.; **71**:2117-2112; 1999.
- [44] – Pauli G. F., Jaki B. U., Lankin D. C.; “A Routine Experimental Protocol for qHNMR Illustrated with Taxol”; J. Nat. Prod; **70**:589-595; 2007.
- [45] – Lambert J., Mazzola E., “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – An introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods”; Prentice Hall; 2013.
- [46] – Garrido C., Silva H., Bathista A. L. B. S., Suman A.; *Espectroscopias: Raios X, RMN, MRI, EPR e Raman*; 1ª edição; 2011.
- [47] – Daeid N. N., Savage K. A., Ramsay D., Holland C., Sutcliffe O. B.; “Development of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and other rapid screening methods for the analysis of 16 «legal high» cathinones derivatives”; Science and Justice; 2013.

- [48] – Correll D. M.; “Development of a Rapid SPME/GC-MS Method for the Detection and Quantification of Synthetic Cathinones in Oral Fluid”; Trinity College Digital Repository; 2013
- [49] – Araújo A. M., Valente M. J., Carvalho M., Dias da Silva D., Gaspar H., Carvalho F., Bastos M. L., Guedes de Pinho P.; “Raising awareness of new psychoactive substances: chemical analysis and *in vitro* toxicity screening of legal high packages containing synthetic cathinones”; 2014.
- [50] – Novo M. G., “Identificación de Substancias Psicoactivas en Drogas Legais”; Tese de Mestrado FCUL; 2013.
- [51] – Michael E. Wieser, Norman Holden, Tyler B. Coplen, John K. Böhlke, Michael Berglund, Willi A. Brand, Paul De Bièvre, Manfred Gröning, Robert D. Loss, Juris Meija, Takafumi Hirata, Thomas Prohaska, Ronny Schoenberg, Glenda O’Connor, Thomas Walczyk, Shige Yoneda, and Xiang-Kun Zhu; “Atomic weights of the elements 2011 (IUPAC Technical Report); Pure Appl. Chem., Vol. 85, No.5; 2013.
- [52] – Guia IPAC OGC007; “Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaaios Químicos”; 2007.
- [53] – Silva R. B.; “Qualidade em Análise Química”; Aulas de apoio Mestrado em Química; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; ano letivo 2012/2013.
- [54] – Silva R. B.; “Modelação do desempenho de métodos analíticos complexos”; Tese de Doutoramento; Universidade de Lisboa; 2004.
- [55] – Rodrigues J. F. P.; “Optimização da incerteza da determinação, por cromatografia iónica, da composição maioritária e vestigial de soluções salinas”; Tese Mestrado FCUL; 2012.
- [56] – Guia IPAC OGC007; “Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaaios Químicos”; 2007.
- [57] – Camões, M. F. G. F. C.; "Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas"; Versão em Português do Guia Eurachem/Citac; 2001.
- [58] – VIM-Guia ISSO/IEC 99:2007 “Vocabulário Internacional de Metrologia” 3ª edição.
- [59] – Internacional Organization for Standartization; “Guide to the expression of Uncertainty in Measurement”; Genebra; 1995.
- [60] – Kragten J.; “Calculating Standard Deviations and Coefidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique”; Analyst Vol. 119; 1994.

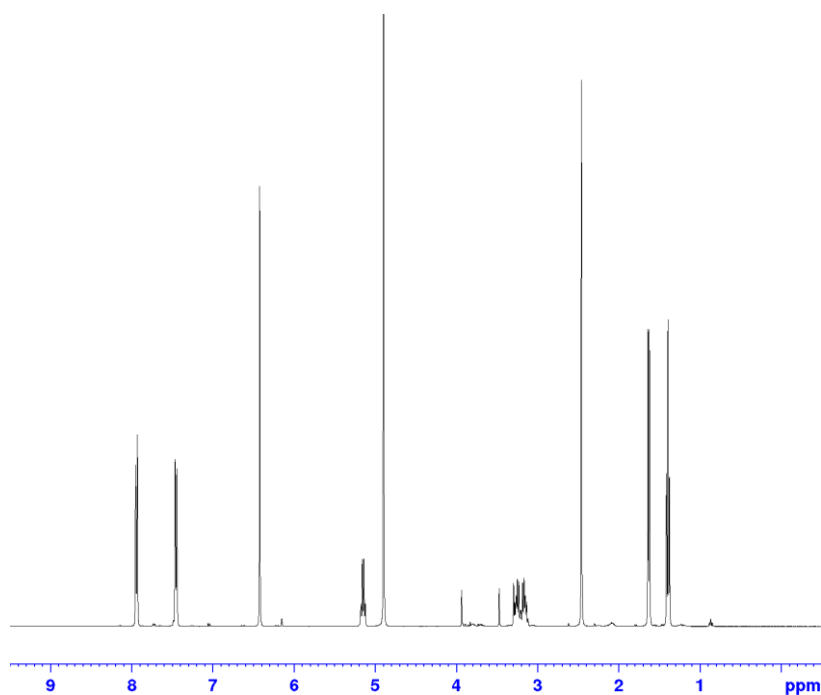
## I. Anexos 1 – Espectros de qRMN de $^1\text{H}$



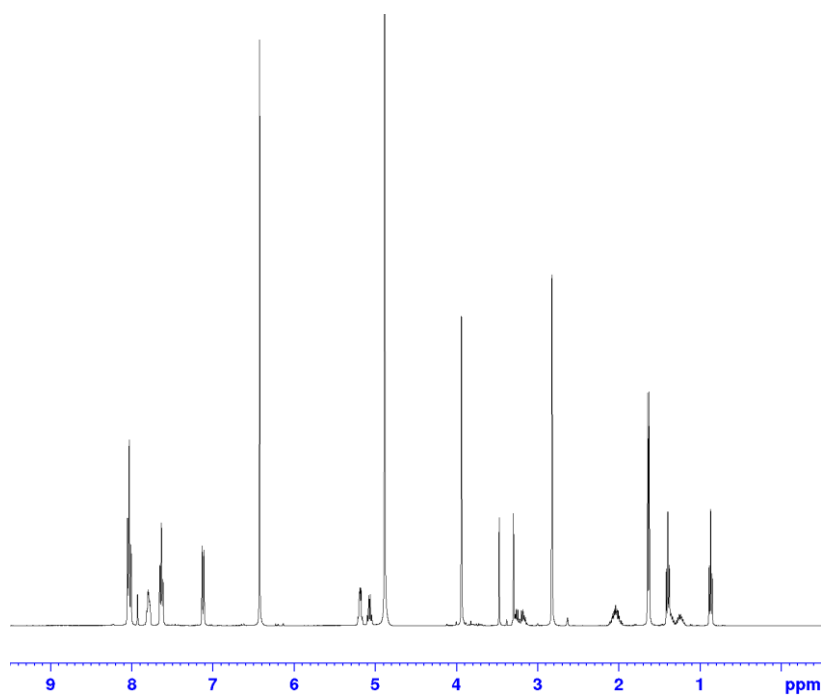
**Figura I.1** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução  $20\text{ mg.mL}^{-1}$  da amostra “Blast01” e um teor de ácido maleico de  $10,34\text{ mg.mL}^{-1}$ .



**Figura I.2** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução  $20\text{ mg.mL}^{-1}$  da amostra “Bliss02” e um teor de ácido maleico de  $10,34\text{ mg.mL}^{-1}$ .

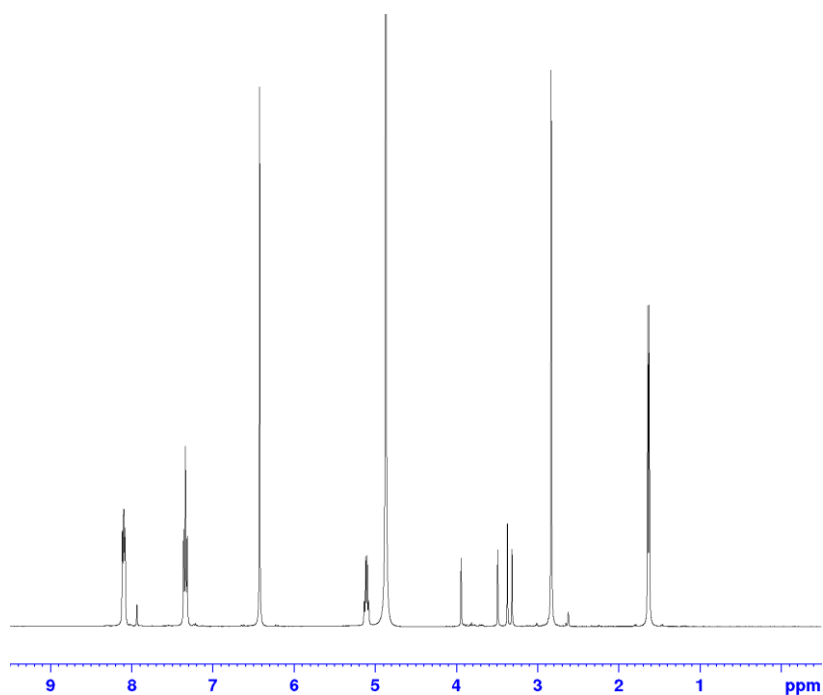


**Figura I.3** – Espectro RMN <sup>1</sup>H, a 400MHz da solução 20 mg.mL<sup>-1</sup> da amostra “Blow04” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL<sup>-1</sup>.

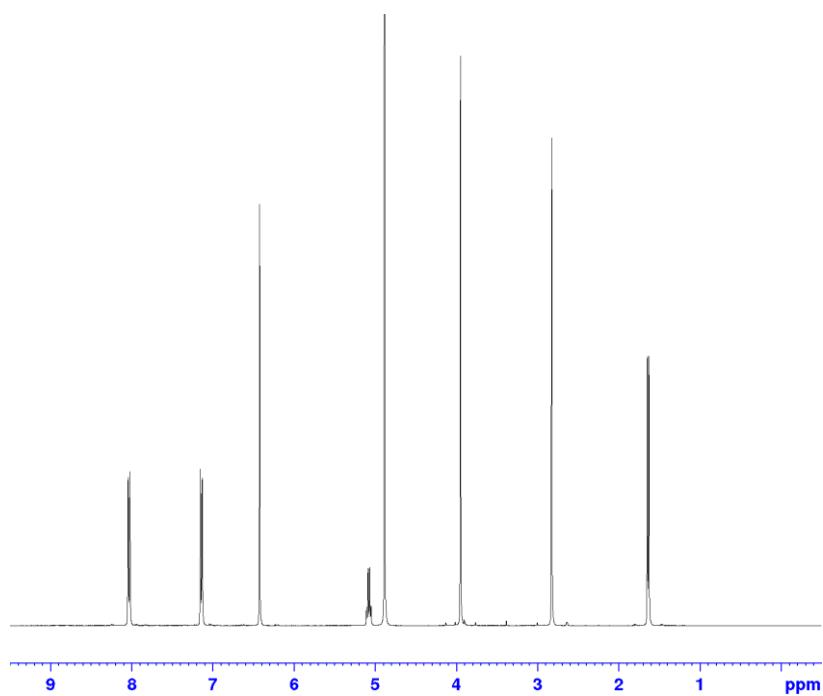


**Figura I.4** – Espectro RMN <sup>1</sup>H, a 400MHz da solução 20 mg.mL<sup>-1</sup> da amostra “Bloom03” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL<sup>-1</sup>.

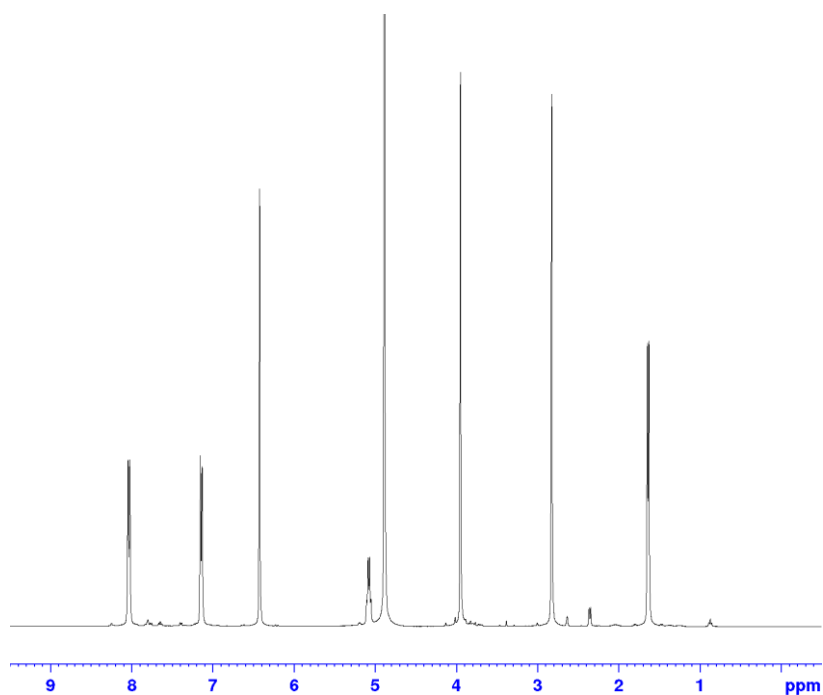




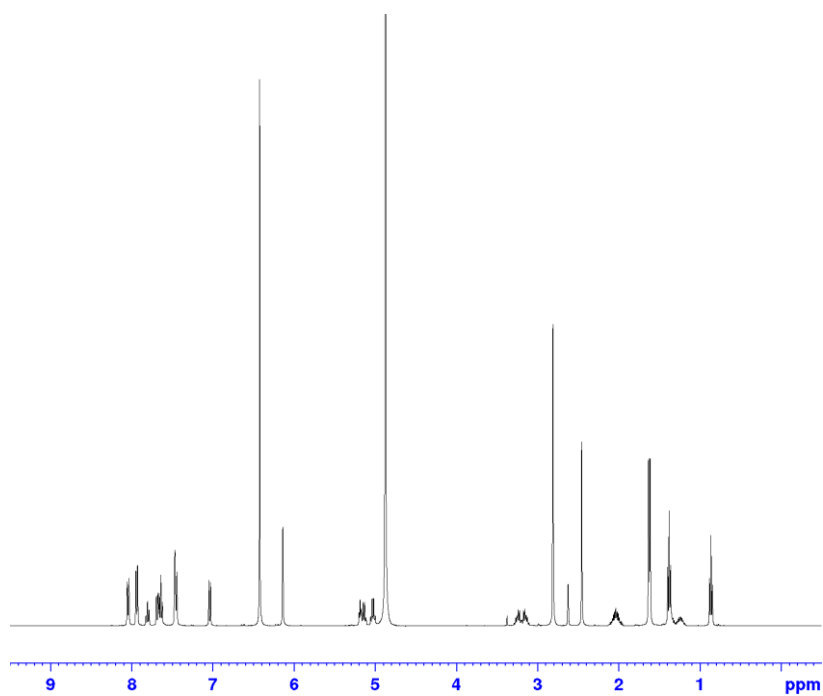
**Figura I.5** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  da amostra “Blast22” e um teor de ácido maleico de 10,34  $\text{mg.mL}^{-1}$ .



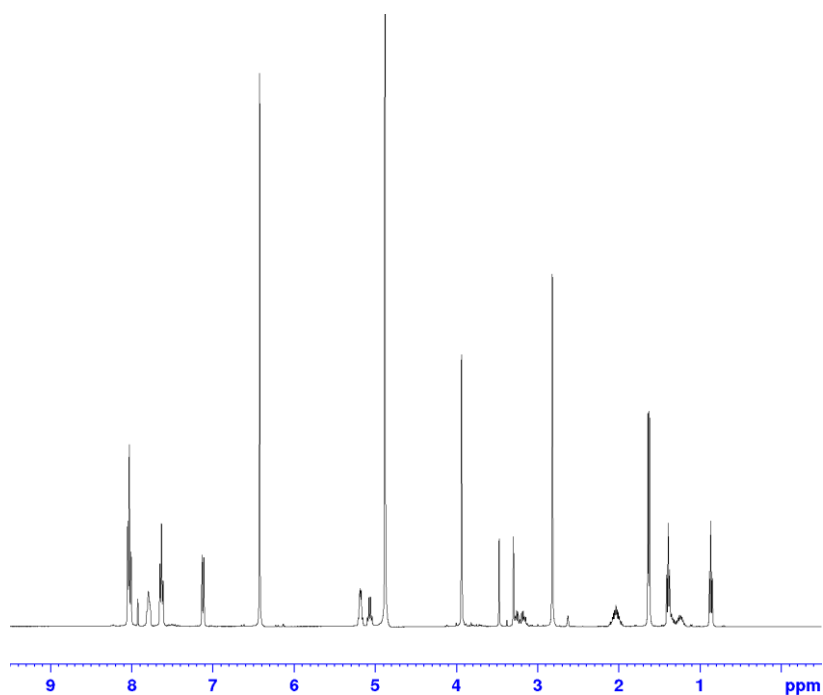
**Figura I.6** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução 20  $\text{mg.mL}^{-1}$  da amostra “Bliss25” e um teor de ácido maleico de 10,34  $\text{mg.mL}^{-1}$ .



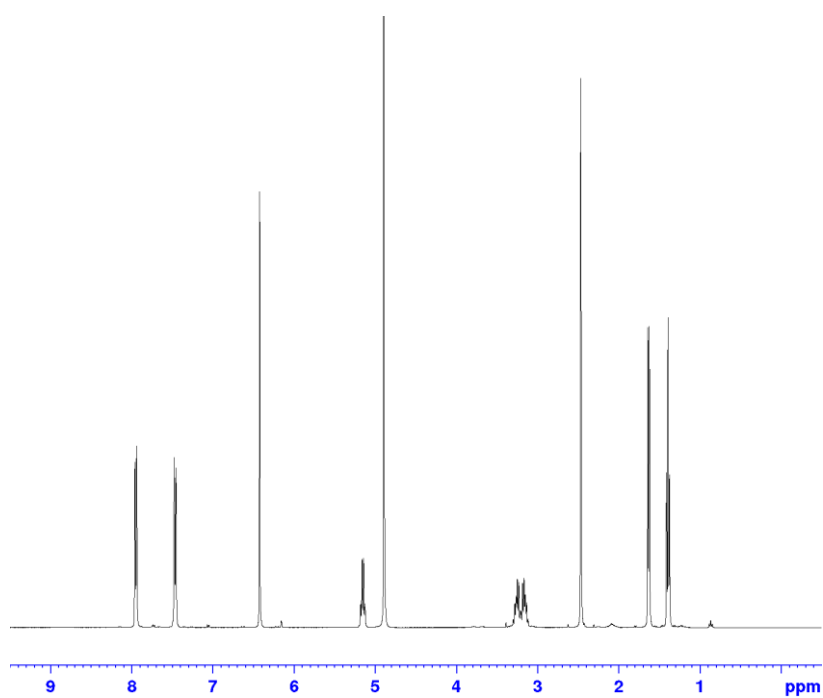
**Figura I.7** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução  $20\text{ mg.mL}^{-1}$  da amostra “Bliss26” e um teor de ácido maleico de  $10,34\text{ mg.mL}^{-1}$ .



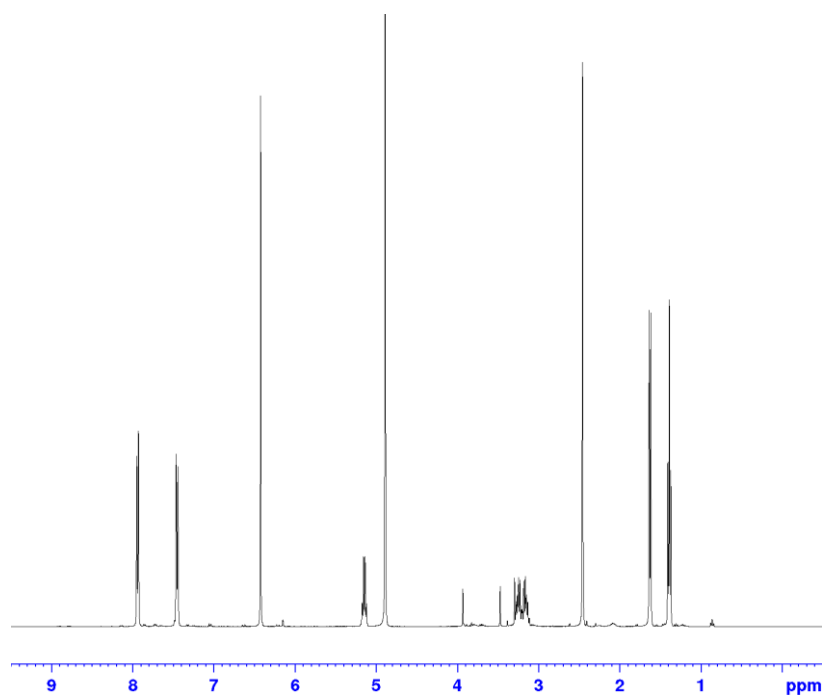
**Figura I.8** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução  $20\text{ mg.mL}^{-1}$  da amostra “Bloom27” e um teor de ácido maleico de  $10,34\text{ mg.mL}^{-1}$ .



**Figura I.9** – Espectro RMN <sup>1</sup>H, a 400MHz da solução 20 mg.mL<sup>-1</sup> da amostra “Bloom28” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura I.10** – Espectro RMN <sup>1</sup>H, a 400MHz da solução 20 mg.mL<sup>-1</sup> da amostra “Blow29” e um teor de ácido maleico de 10,34 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura I.11** – Espectro RMN  $^1\text{H}$ , a 400MHz da solução  $20\text{ mg.mL}^{-1}$  da amostra “Blow30” e um teor de ácido maleico de  $10,34\text{ mg.mL}^{-1}$ .

## II. Anexos 2 – Tabelas de desvios químicos

**Tabela II.1**– Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de felfedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	δPI	δH3	δH10	δH2	δH6/H8	δH5/H9
1	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
2	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
3	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
4	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
5	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
6	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
7	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
8	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
9	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
10	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11

**Tabela II.2** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de felfedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	δPI	δH3	δH10	δH2	δH6/H8	δH5/H9
1	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
2	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
3	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
4	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
5	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
6	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
7	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
8	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
9	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11
10	6,42	1,63	2,83	5,11	7,35	8,11

**Tabela II.3** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de felfedrona da solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	$\delta$ PI	$\delta$ H3	$\delta$ H10	$\delta$ H2	$\delta$ H6/H8	$\delta$ H5/H9
1	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,12
2	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
3	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
4	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
5	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
6	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
7	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
8	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
9	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13
10	6,42	1,65	2,84	5,12	7,37	8,13

**Tabela II.4** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	$\delta$ PI	$\delta$ H3	$\delta$ H10	$\delta$ H11	$\delta$ H2	$\delta$ H6/H8	$\delta$ H5/H9
1	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
2	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
3	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
4	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
5	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
6	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
7	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
8	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
9	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03
10	6,42	1,63	2,82	3,94	5,07	7,14	8,03

**Tabela II.5** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	$\delta$ PI	$\delta$ H3	$\delta$ H10	$\delta$ H11	$\delta$ H2	$\delta$ H6/H8	$\delta$ H5/H9
1	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
2	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
3	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
4	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
5	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
6	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
7	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
8	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
9	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06
10	6,42	1,64	2,82	3,96	5,08	7,17	8,06

**Tabela II.6** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de metedrona da solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	$\delta$ PI	$\delta$ H3	$\delta$ H10	$\delta$ H11	$\delta$ H2	$\delta$ H6/H8	$\delta$ H5/H9
1	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07
2	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07
3	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07
4	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07
5	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,06
6	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07
7	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,06
8	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,06
9	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,06
10	6,42	1,64	2,82	3,97	5,09	7,18	8,07

**Tabela II.7** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	δPI	δH3	δH10	δH11	δH2
1	6,42	1,39	1,63	2,45	5,14
2	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15
3	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15
4	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15
5	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15
6	6,42	1,39	1,63	2,45	5,15
7	6,42	1,39	1,63	2,45	5,15
8	6,42	1,39	1,63	2,45	5,15
9	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15
10	6,42	1,39	1,63	2,46	5,15

**Tabela II.8** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	δPI	δH3	δH10	δH11	δH2
1	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
2	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
3	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
4	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
5	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
6	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
7	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
8	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
9	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15
10	6,42	1,38	1,63	2,47	5,15



**Tabela II.9** – Valores dos desvios químicos (ppm) de 10 réplicas, obtidas em condições de repetibilidade, de sinais de 4-MEC da solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	$\delta\text{PI}$	$\delta\text{H3}$	$\delta\text{H10}$	$\delta\text{H11}$	$\delta\text{H2}$
1	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
2	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
3	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
4	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
5	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
6	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
7	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
8	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
9	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15
10	6,42	1,38	1,63	2,48	5,15

### III. Anexos 3 – Tabelas de dados das integrações

**Tabela III.1** – Intervalos de desvios químicos (ppm) definidos para a integração dos vários sinais das catinonas flefedrona, metedrona e 4-MEC.

Amostra	Blast01	Bliss02	Blow04
Catinona	Flefedrona	Metedrona	4-MEC
$\delta$ PI	$[\delta\text{PI} - 0,05; \delta\text{PI} + 0,05]$	$[\delta\text{PI} - 0,05; \delta\text{PI} + 0,05]$	$[\delta\text{PI} - 0,05; \delta\text{PI} + 0,05]$
$\delta$ H3	$[\delta\text{H3} - 0,05; \delta\text{H3} + 0,05]$	$[\delta\text{H3} - 0,05; \delta\text{H3} + 0,05]$	$[\delta\text{H3} - 0,05; \delta\text{H3} + 0,05]$
$\delta$ H10	$[\delta\text{H10} - 0,04; \delta\text{H10} + 0,04]$	$[\delta\text{H10} - 0,04; \delta\text{H10} + 0,04]$	$[\delta\text{H10} - 0,05; \delta\text{H10} + 0,05]$
$\delta$ H11		$[\delta\text{H11} - 0,04; \delta\text{H11} + 0,04]$	$[\delta\text{H11} - 0,05; \delta\text{H11} + 0,05]$
$\delta$ H2	$[\delta\text{H2} - 0,05; \delta\text{H2} + 0,05]$	$[\delta\text{H2} - 0,05; \delta\text{H2} + 0,05]$	$[\delta\text{H2} - 0,05; \delta\text{H2} + 0,05]$
$\delta$ H6/H8	$[\delta\text{H6/H8} - 0,05; \delta\text{H6/H8} + 0,05]$	$[\delta\text{H6/H8} - 0,05; \delta\text{H6/H8} + 0,05]$	$[\delta\text{H6/H8} - 0,05; \delta\text{H6/H8} + 0,05]$
$\delta$ H5/H9	$[\delta\text{H5/H9} - 0,05; \delta\text{H5/H9} + 0,05]$	$[\delta\text{H5/H9} - 0,05; \delta\text{H5/H9} + 0,05]$	$[\delta\text{H5/H9} - 0,05; \delta\text{H5/H9} + 0,05]$

**Tabela III.2** – Valores das integrações dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	PI	H3	H10	H2	H5/H9	H6/H8
1	100,00	147,57	147,48	48,84	98,09	97,99
2	100,00	147,51	147,56	48,83	98,08	98,03
3	100,00	147,49	147,48	48,91	98,09	98,00
4	100,00	147,51	147,53	48,88	98,11	98,01
5	100,00	147,46	147,44	48,91	98,05	97,99
6	100,00	147,57	147,56	48,72	98,12	98,05
7	100,00	147,52	147,49	48,88	98,06	98,99
8	100,00	147,51	147,47	48,94	98,09	98,06
9	100,00	147,49	147,46	48,92	98,07	98,04
10	100,00	147,55	147,45	47,45	98,08	98,03

**Tabela III.3** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,48	1,47	0,49	0,98	0,98
2	1,48	1,48	0,49	0,98	0,98
3	1,47	1,47	0,49	0,98	0,98
4	1,48	1,48	0,49	0,98	0,98
5	1,47	1,47	0,49	0,98	0,98
6	1,48	1,48	0,49	0,98	0,98
7	1,48	1,47	0,49	0,98	0,99
8	1,48	1,47	0,49	0,98	0,98
9	1,47	1,47	0,49	0,98	0,98
10	1,48	1,47	0,47	0,98	0,98
<b>Média</b>	1,48	1,47	0,49	0,98	0,98
<b>Desvio Padrão</b>	3,51E-04	4,39E-04	4,54E-03	2,17E-04	3,05E-03

**Tabela III.4** – Valores da integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	PI	H3	H10	H2	H5/H9	H6/H8
1	100,00	145,15	145,15	49,53	96,97	96,84
2	100,00	144,92	144,85	50,26	96,95	96,81
3	100,00	145,36	144,92	49,51	96,97	96,84
4	100,00	146,99	143,89	47,32	96,61	96,79
5	100,00	145,87	143,20	48,19	96,45	96,69
6	100,00	144,34	142,94	49,88	96,46	96,57
7	100,00	145,20	143,47	47,99	96,64	96,75
8	100,00	147,92	144,61	46,54	96,63	96,86
9	100,00	144,27	144,06	50,97	96,61	96,69
10	100,00	147,29	144,21	48,38	96,72	96,91

**Tabela III.5** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,45	1,45	0,50	0,97	0,97
2	1,45	1,45	0,50	0,97	0,97
3	1,45	1,45	0,50	0,97	0,97
4	1,47	1,44	0,47	0,97	0,97
5	1,46	1,43	0,48	0,97	0,96
6	1,44	1,43	0,50	0,97	0,96
7	1,45	1,43	0,48	0,97	0,97
8	1,48	1,45	0,47	0,97	0,97
9	1,44	1,44	0,51	0,97	0,97
10	1,47	1,44	0,48	0,97	0,97
<b>Média</b>	1,46	1,44	0,49	0,97	0,97
<b>Desvio Padrão</b>	1,26E-02	7,60E-03	1,39E-02	1,01E-03	1,99E-03

**Tabela III.6** – Valores da integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	PI	H3	H10	H2	H5/H9	H6/H8
1	100	144,03	144,16	52,74	96,89	96,89
2	100	142,88	141,94	54,08	96,51	96,36
3	100	143,57	142,57	52,21	96,77	96,30
4	100	141,92	141,03	55,21	96,36	96,05
5	100	143,58	142,52	51,76	96,66	96,29
6	100	148,35	145,12	44,64	97,12	97,29
7	100	142,96	141,79	53,28	96,47	96,26
8	100	141,24	139,77	57,81	96,37	96,45
9	100	138,70	140,46	61,32	96,21	96,54
10	100	141,50	140,63	56,70	96,39	96,07

**Tabela III.7** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da flefedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blast01 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	I <sub>H3</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>P1</sub>
1	1,44	1,44	0,53	0,97	0,97
2	1,43	1,42	0,54	0,96	0,97
3	1,44	1,43	0,52	0,96	0,97
4	1,42	1,41	0,55	0,96	0,96
5	1,44	1,43	0,52	0,96	0,97
6	1,48	1,45	0,45	0,97	0,97
7	1,43	1,42	0,53	0,96	0,96
8	1,41	1,40	0,58	0,96	0,96
9	1,39	1,40	0,61	0,97	0,96
10	1,41	1,41	0,57	0,96	0,96
<b>Média</b>	1,43	1,42	0,54	0,96	0,97
<b>Desvio Padrão</b>	2,48E-02	1,67E-02	4,41E-02	3,80E-03	2,80E-03

**Tabela III.8** – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	AM	H3	H10	H11	H2	H6/H8	H5/H9
1	100	143,39	143,45	142,45	47,61	95,09	95,21
2	100	143,50	143,40	142,47	47,43	95,08	95,21
3	100	143,59	143,59	142,64	47,35	95,11	95,25
4	100	143,37	143,46	142,52	47,62	95,06	95,20
5	100	143,34	143,44	142,50	47,68	95,00	95,20
6	100	143,48	143,49	142,44	47,38	95,06	95,20
7	100	143,51	143,46	142,53	47,34	95,04	95,17
8	100	143,45	143,51	142,55	47,42	95,06	95,19
9	100	143,58	143,55	142,59	47,28	95,08	95,21
10	100	143,52	143,59	142,64	47,64	95,11	95,26

**Tabela III.9** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,43	1,43	1,42	0,48	0,95	0,95
2	1,44	1,43	1,42	0,47	0,95	0,95
3	1,44	1,44	1,43	0,47	0,95	0,95
4	1,43	1,43	1,43	0,48	0,95	0,95
5	1,43	1,43	1,42	0,48	0,95	0,95
6	1,43	1,43	1,42	0,47	0,95	0,95
7	1,44	1,43	1,43	0,47	0,95	0,95
8	1,43	1,44	1,43	0,47	0,95	0,95
9	1,44	1,44	1,43	0,47	0,95	0,95
10	1,44	1,44	1,43	0,48	0,95	0,95
<b>Média</b>	1,43	1,43	1,43	0,47	0,95	0,95
<b>Desvio Padrão</b>	8,54E-04	6,60E-04	7,25E-04	1,47E-03	3,33E-04	2,72E-04

**Tabela III.10** – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	PI	H3	H10	H11	H2	H5/H9	H6/H8
1	100,00	142,91	142,75	142,03	48,14	95,11	95,04
2	100,00	144,17	141,56	141,55	47,35	95,10	94,90
3	100,00	142,58	142,63	141,82	48,38	95,06	94,98
4	100,00	142,01	140,83	140,20	49,47	94,78	94,79
5	100,00	144,67	141,74	141,75	48,07	94,97	94,83
6	100,00	145,37	142,09	142,33	49,72	95,04	94,85
7	100,00	144,52	141,63	141,65	49,64	94,93	94,80
8	100,00	143,37	141,04	140,71	47,87	94,99	94,77
9	100,00	143,86	141,35	141,12	48,71	95,07	94,87
10	100,00	143,70	141,45	141,24	47,05	94,94	94,85

**Tabela III.11** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,43	1,43	1,42	0,48	0,95	0,95
2	1,44	1,42	1,42	0,47	0,95	0,95
3	1,43	1,43	1,42	0,48	0,95	0,95
4	1,42	1,41	1,40	0,49	0,95	0,95
5	1,45	1,42	1,42	0,48	0,95	0,95
6	1,45	1,42	1,42	0,50	0,95	0,95
7	1,45	1,42	1,42	0,50	0,95	0,95
8	1,43	1,41	1,41	0,48	0,95	0,95
9	1,44	1,41	1,41	0,49	0,95	0,95
10	1,44	1,41	1,41	0,47	0,95	0,95
<b>Média</b>	1,44	1,42	1,41	0,48	0,95	0,95
<b>Desvio Padrão</b>	1,03E-02	6,25E-03	6,38E-03	9,35E-03	8,57E-04	9,82E-04

**Tabela III.12** – Valores da integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	PI	H3	H10	H11	H2	H5/H9	H6/H8
1	100,00	141,99	141,64	140,96	48,83	94,95	95,08
2	100,00	140,21	138,95	138,24	53,02	94,87	94,86
3	100,00	140,79	140,69	139,92	51,47	94,79	94,75
4	100,00	145,14	141,87	142,51	48,00	95,35	95,16
5	100,00	145,09	141,91	142,57	47,82	95,08	94,95
6	100,00	144,62	141,42	141,96	49,66	95,37	95,04
7	100,00	144,69	141,60	142,14	49,09	95,16	94,91
8	100,00	141,84	139,99	139,74	46,24	94,82	94,88
9	100,00	140,91	139,93	139,43	49,38	94,53	94,75
10	100,00	142,13	140,18	140,07	45,99	95,36	94,91

**Tabela III.13** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da metedrona nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Bliss02 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	I <sub>H3</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H5H9</sub> /I <sub>P1</sub>	I <sub>H6H8</sub> /I <sub>P1</sub>
1	1,42	1,42	1,41	0,49	0,95	0,95
2	1,40	1,39	1,38	0,53	0,95	0,95
3	1,41	1,41	1,40	0,51	0,95	0,95
4	1,45	1,42	1,43	0,48	0,95	0,95
5	1,45	1,42	1,43	0,48	0,95	0,95
6	1,45	1,41	1,42	0,50	0,95	0,95
7	1,45	1,42	1,42	0,49	0,95	0,95
8	1,42	1,40	1,40	0,46	0,95	0,95
9	1,41	1,40	1,39	0,49	0,95	0,95
10	1,42	1,40	1,40	0,46	0,95	0,95
<b>Média</b>	1,43	1,41	1,41	0,49	0,95	0,95
<b>Desvio Padrão</b>	1,94E-02	1,02E-02	1,49E-02	2,16E-02	2,86E-03	1,35E-03

**Tabela III.14** – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	AM	H10	H3	H11	H2
1	100,00	150,85	150,75	150,58	51,05
2	100,00	150,67	150,75	150,54	50,62
3	100,00	150,03	150,67	150,59	50,87
4	100,00	150,43	150,73	150,53	50,72
5	100,00	150,49	150,62	150,45	51,32
6	100,00	150,93	150,67	150,54	50,97
7	100,00	150,10	150,66	150,58	50,89
8	100,00	150,98	150,67	150,57	50,93
9	100,00	150,87	150,67	150,55	51,02
10	100,00	150,09	150,69	150,56	50,90



**Tabela III.15** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 20 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,51	1,51	1,51	0,51
2	1,51	1,51	1,51	0,51
3	1,51	1,50	1,51	0,51
4	1,51	1,50	1,51	0,51
5	1,51	1,50	1,50	0,51
6	1,51	1,51	1,51	0,51
7	1,51	1,50	1,51	0,51
8	1,51	1,51	1,51	0,51
9	1,51	1,51	1,51	0,51
10	1,51	1,50	1,51	0,51
<b>Média</b>	1,51	1,51	1,51	0,51
<b>Desvio Padrão</b>	4,29E-04	3,70E-03	3,98E-04	1,89E-03

**Tabela III.16** – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	PI	H3	H10	H11	H2
1	100,00	150,39	149,93	150,14	51,90
2	100,00	150,41	150,17	150,15	52,13
3	100,00	149,82	149,78	149,58	53,09
4	100,00	150,05	149,17	149,93	51,23
5	100,00	151,65	151,65	151,23	51,27
6	100,00	151,89	151,60	151,51	50,53
7	100,00	149,36	148,85	149,18	52,49
8	100,00	151,46	151,56	151,10	51,11
9	100,00	151,26	150,71	150,90	51,12
10	100,00	150,63	149,18	150,16	52,34

**Tabela III.17** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 4 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,50	1,50	1,50	0,52
2	1,50	1,50	1,50	0,52
3	1,50	1,50	1,50	0,53
4	1,50	1,49	1,50	0,51
5	1,52	1,52	1,51	0,51
6	1,52	1,52	1,52	0,51
7	1,49	1,49	1,49	0,52
8	1,51	1,52	1,51	0,51
9	1,51	1,51	1,51	0,51
10	1,51	1,49	1,50	0,52
<b>Média</b>	1,51	1,50	1,50	0,52
<b>Desvio Padrão</b>	8,42E-03	1,07E-02	7,63E-03	7,91E-03

**Tabela III.18** – Valores da integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaios	PI	H3	H10	H11	H2
1	100,00	149,26	149,32	149,17	53,07
2	100,00	148,94	148,44	148,72	54,48
3	100,00	149,77	149,69	149,70	52,48
4	100,00	149,26	147,64	148,60	55,56
5	100,00	157,88	157,48	155,80	60,69
6	100,00	151,38	151,08	151,27	51,88
7	100,00	148,71	148,90	148,79	52,06
8	100,00	151,71	152,04	151,39	51,67
9	100,00	153,20	153,09	152,82	49,80
10	100,00	152,13	152,39	152,00	49,72

**Tabela III.19** – Valores das razões de integração dos diferentes sinais da 4-MEC nos 10 ensaios replicados, obtidos em condições de repetibilidade, para a solução amostra Blow04 com uma concentração de amostra de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ensaio	I <sub>H3</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H10</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H11</sub> /I <sub>PI</sub>	I <sub>H2</sub> /I <sub>PI</sub>
1	1,49	1,49	1,49	0,53
2	1,49	1,48	1,49	0,54
3	1,50	1,50	1,50	0,52
4	1,49	1,48	1,49	0,56
5	1,58	1,57	1,56	0,61
6	1,51	1,51	1,51	0,52
7	1,49	1,49	1,49	0,52
8	1,52	1,52	1,51	0,52
9	1,53	1,53	1,53	0,50
10	1,52	1,52	1,52	0,50
<b>Média</b>	1,51	1,51	1,51	0,53
<b>Desvio Padrão</b>	2,80E-02	2,91E-02	2,31E-02	3,21E-02

**Tabela III.20** – Valores de integração dos sinais das catinonas utilizados para quantificar as amostras dos produtos das *smartshops*.

Amostras	PI	H10	H11
Bloom03	100,00	98,63	
Blast22	100,00	130,96	
Bliss25	100,00	145,98	
Bliss26	100,00	138,50	
Bloom27	100,00		43,04
Bloom28	100,00	88,07	
Blow29	100,00		151,52
Blow30	100,00		136,81

**Tabela III.21** – Valores das razões da integração para o sinal utilizado para quantificar a flefedrona, a metedrona, e a 4-MEC nas amostras dos produtos das *smartshops*.

<b>Amostras</b>	<b>I<sub>H10</sub>/I<sub>P1</sub></b>	<b>I<sub>H11</sub>/I<sub>P1</sub></b>
Bloom03	0,99	
Blast22	1,31	
Bliss25	1,46	
Bliss26	1,39	
Bloom27		0,43
Bloom28	0,88	
Blow29		1,52
Blow30		1,37

## IV. Anexos 4 – Cálculos das incertezas

Incerteza padrão da massa molar da flefedrona,  $u_{M_{Flefedrona}}$ :

$$u_C = \frac{12,0116 - 12,0096}{\sqrt{3}} = 0,0012$$

$$u_H = \frac{1,00811 - 1,00784}{\sqrt{3}} = 1,56 \times 10^{-4}$$

$$u_N = \frac{14,00728 - 14,00643}{\sqrt{3}} = 4,91 \times 10^{-4}$$

$$u_O = \frac{15,99977 - 15,99903}{\sqrt{3}} = 4,27 \times 10^{-4}$$

$$u_F = \frac{0,0000005}{\sqrt{3}} = 2,89 \times 10^{-7}$$

$$u_{Cl} = \frac{35,457 - 35,446}{\sqrt{3}} = 6,35 \times 10^{-3}$$

Em que  $u_i$  é a incerteza padrão da massa molar do elemento i.

$$u_{M_{Flephedrone}} = \sqrt{10 \times (u_C)^2 + 13 \times (u_H)^2 + (u_N)^2 + (u_O)^2 + (u_F)^2 + (u_{Cl})^2}$$

Incerteza da massa molar da metedrona,  $u_{M_{Methedrone}}$ :

Em que  $u_i$  é a incerteza padrão da massa molar do elemento i.

$$u_{M_{Methedrone}} = \sqrt{11 \times (\mu_C)^2 + 16 \times (\mu_H)^2 + (\mu_N)^2 + 2 \times (\mu_O)^2 + (\mu_{Cl})^2}$$

Incerteza da massa molar da 4-MEC,  $\mu_{M_{4-MEC}}$ :

Em que  $u_i$  é a incerteza padrão da massa molar do elemento i.

$$u_{M_{4-MEC}} = \sqrt{12 \times (u_C)^2 + 18 \times (u_H)^2 + (u_N)^2 + (u_O)^2}$$

Incerteza da massa molar do ácido maleico,  $\mu_{M_{ácido\ maleico}}$ :

Em que  $u_i$  é a incerteza padrão da massa molar do elemento i.

$$u_{M_{ácido\ maleico}} = \sqrt{4 \times (u_C)^2 + 4 \times (u_H)^2 + 4 \times (u_O)^2}$$

Incerteza associada à medição de 10mL com a micropipeta:

$$V_1 = 0.01L$$

$$E = 2,07 \times 10^{-5}$$

$$\Delta T = 4$$

$$u_V^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times E}{1,96} = 4,22 \times 10^{-7} mL$$

$$u_V^{Calib} = \frac{tolerância}{\sqrt{3}} = \frac{6,00 \times 10^{-5}}{\sqrt{3}} = 3,46 \times 10^{-5} mL$$

A tolerância foi a estimada pelo fabricante para um equipamento em boas condições de operação.

$$u_V^{Rep} = \text{repetibilidade da micropipeta} = 3,00 \times 10^{-5} mL$$

$$u_{V_1} = \sqrt{(u_V^{Calib})^2 + (u_V^{Rep})^2 + (u_V^{Temp})^2} = 4,58 \times 10^{-5} mL$$

Incerteza à medição de 500 µL com a seringa:

$$V_2 = 500\mu L = 0,0005L$$

$$E = 2,07 \times 10^{-5}$$

$$\Delta T = 4$$

$$\mu_V^{Temp} = \frac{V \times \Delta T \times E}{1,96} = 2,11 \times 10^{-8} mL$$

$$\mu_V^{Calib} = \frac{tolerância}{\sqrt{3}} = \frac{5,15 \times 10^{-6}}{\sqrt{3}} = 2,97 \times 10^{-6} mL$$

$$\mu_V^{Rep} = \text{repetibilidade da seringa} = 3,52 \times 10^{-6} mL$$

$$\mu_{V_2} = \sqrt{(\mu_V^{Calib})^2 + (\mu_V^{Rep})^2 + (\mu_V^{Temp})^2} = 4,60 \times 10^{-6} mL$$

Incerteza associada a uma diluição 1+4:

$$V_{\text{solução}} (100\mu L) + V_{\text{solvente}} (400\mu L)$$

$$V_{\text{solução}} (100\mu L) - V_S$$

$$V_{\text{solvente}} (400\mu L) - V_A$$

$$Fd = 1+4 = 5$$

$$F_d = \frac{V_S + V_A}{V_S} = 1 + \frac{V_A}{V_S}$$

$$\left( \frac{u'_{\frac{V_A}{V_S}}}{4} \right) = \sqrt{\left( \frac{u_{V_S}}{V_S} \right)^2 + \left( \frac{u_{V_A}}{V_A} \right)^2} = 0,09464$$

$$u_{\frac{V_A}{V_S}} = 4 \times 0,09464 = 0,37858 = u_{F_d}$$

$$u'_{F_d} = \frac{0,37858}{5} = 0,07572$$

Incerteza associada a uma diluição de 1+9:

$$V_{\text{solução}} (100\mu\text{L}) + V_{\text{solvente}} (900\mu\text{L})$$

$$V_{\text{solução}} (100\mu\text{L}) - V_S$$

$$V_{\text{solvente}} (900\mu\text{L}) - V_A$$

$$F_d = 1+9 = 10$$

$$F_d = \frac{V_S + V_A}{V_S} = 1 + \frac{V_A}{V_S}$$

$$\left( \frac{u'_{\frac{V_A}{V_S}}}{9} \right) = \sqrt{\left( \frac{u_{V_S}}{V_S} \right)^2 + \left( \frac{u_{V_A}}{V_A} \right)^2} = 0,03537$$

$$u_{\frac{V_A}{V_S}} = 9 \times 0,03537 = 0,31830 = u_{F_d}$$

$$u'_{F_d} = \frac{0,31830}{10} = 0,03183$$